

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁴ : C12N 1/20, 15/00, C07H 21/04 // (C12P 21:02, C12N 1:20 C12R 1:05, 1:19, 1:38)	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 88/ 0164 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. März 1988 (10.03.88)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE87/00392		(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), D (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), G (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JI LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent SE (europäisches Patent), US.
(22) Internationales Anmeldedatum: 28. August 1987 (28.08.87)		
(31) Prioritätsaktenzeichen: P 36 29 890.5		
(32) Prioritätsdatum: 29. August 1986 (29.08.86)		
(33) Prioritätsland: DE		
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstr. 170 - 178, D-1000 Berlin 65 (DE).		
(72) Erfinder; und		
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STREBER, Wolfgang, R. [DE/DE]; Forststr. 43, D-1000 Berlin 41 (DE). TIMMIS, Kenneth, N. [GB/CH]; 6a, avenue de la Fontenelle, CH-1292 Chambésy (CH). ZENK, Meinhart, H. [DE/DE]; Pfeilstielstr. 17, D-8000 München 60 (DE).		

(54) Title: MICRO-ORGANISMS AND PLASMIDS FOR PRODUCING 2,4-DICHLOROPHOENOXY ACETIC ACID (2,4-D)-MONOOXYGENASE AND PROCESS FOR PRODUCING THESE PLASMIDS AND STRAINS

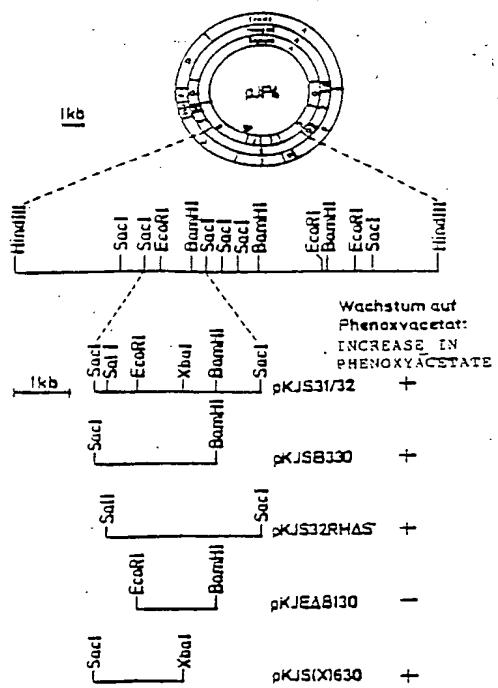
(54) Bezeichnung: MICROORGANISMEN UND PLASMIDE FÜR DIE 2,4-DICHLOROPHOENOXYSSIGSÄURE (2,4-D)-MONOOXYGENASE - BILDUNG UND VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG DIESER PLASMIDE UND STÄMME

(57) Abstract

A description is given of the manufacture by genetic engineering and the use of plasmids and bacterial strains containing the gene tfdA or a gene practically identical to the latter on a short DNA section which can be precisely characterized. The new plasmids and micro-organisms are suited for the production of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)-monooxygenase and as initial products for the transmission, by genetic engineering, to various organisms of the 2,4-D-decomposing characteristic of this enzyme.

(57) Zusammenfassung

Gentechnische Herstellung und Verwendung von Plasmiden und Bakterienstämmen, die das Gen tfdA oder ein mit tfdA fast identisches Gen auf einem kurzen, genau charakterisierbaren DNA-Abschnitt enthalten. Die neuen Plasmide und Mikroorganismen eignen sich zur Produktion von 2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure)-monooxygenase und als Ausgangsprodukte für die gentechnische Übertragung der 2,4-D-abbauenden Eigenschaft dieses Enzyms auf verschiedene Organismen.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabun	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	HU	Ungarn	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	IT	Italien	RO	Rumänien
BJ	Benin	JP	Japan	SD	Sudan
BR	Brasilien	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	TG	Togo
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
FI	Finnland	ML	Mali		

- 1 -

Microorganismen und Plasmide für die 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)-monooxygenase - Bildung und Verfahren zur Herstellung dieser Plasmide und Stämme

Die vorliegende Erfindung betrifft die gentechnische Herstellung von Plasmiden und Bakterienstämmen, die das Gen *tfdB* oder ein im Wesentlichen mit *tfdB* identisches Gen auf einem kurzen genau charakterisierbaren DNA-Ab schnitt enthalten. Die neuen Plasmide und Mikroorganismen eignen sich besonders gut zur Produktion von 2,4-D-monooxygenase sowie als Ausgangs produkt für die gentechnische Übertragung der 2,4-D-abbauenden Eigen schaften dieses Enzyms auf verschiedene Organismen (einschließlich der damit erreichbaren 2,4-D-Toleranz bei genetisch transformierten Pflanzen).

Die 2,4-D-monooxygenase ist ein Enzym, das in vielen 2,4-D-abbauenden Organismen den ersten Schritt bei der Metabolisierung von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) katalysiert. Zu 2,4-D-abbauenden Organismen gehören besonders Bodenbakterien wie z.B. *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium* und *Pseudomonas* [vgl. hierzu G.R. Bell, Can. J. Microbiol. 3:821 (1957); J.M. Bollag et al., J. Agric. Food Chem. 16:826 (1968); R.H. Don et al., J. Bacteriol. 145:681 (1981); W.C. Evans et al., Proc. Biochem. Soc. Biochem. J. 57:4 (1954); W.C. Evans et al., Biochem. J. 122:543 (1971); R.P. Fisher et al., J. Bacteriol. 135:798 (1978); T.I. Steenson et al., J. Gen. Microbiol. 16:146 (1957); J.M. Tiedje et al., J. Agric. Food Chem. 17:1080 (1969); J.E. Tyler et al., Appl. Microbiol. 28:181 (1974); J.M. Tiedje et al., J. Agric. Food Chem. 17:1021 (1969)]. Sie spielen bei der Entgiftung des Erdbodens und der Abwässer von halogenierten aromatischen Verbindungen, wie sie gerade unter den landwirtschaftlich ge nutzten Pestiziden und Herbiziden vorkommen, eine bedeutende Rolle.

In der Gruppe der 2,4-D-abbauenden Wildtypbakterien ist der Stamm *Al caligenes eutrophus* JMP134 der bekannteste und am besten charakterisierte. Er beherbergt das etwa 80 Kilobasen große Plasmid *pJP4*, das sämtliche für den Abbau von 2,4-D wichtigen Gene enthält (R.H. Don et al., l.c.). Das Plasmid *pJP4* wurde kürzlich auch isoliert und charakterisiert [R.H. Don et al., J. Bacteriol. 161:466 (1985)].

Fünf am Abbau von 2,4-D beteiligte Gene, bezeichnet als *tfdB*, *tfdC*, *tfdD*, *tfdE* und *tfdF*, wurden durch Transposonmutagenese lokalisiert und in *E. coli* kloniert. Vier Genen konnte dabei von R.H. Don et al. [J. Bacteriol. 161:85 (1985)] durch biochemische Studien eine Enzymfunktion zugeordnet werden.

Es ist jedoch bisher noch nicht gelungen, das Gen *tfda* auf dem Plasmid ϕ JP4 oder auf einem Subfragment von diesem zu lokalisieren, zu isolieren und seine Struktur aufzuklären.

Durch die vorliegende Erfindung ist es nun erstmals gelungen, das Gen *tfda* zu isolieren, klonieren und charakterisieren. Es ist damit möglich, dieses Gen für eine Übertragung auf andere Organismen verfügbar zu machen mit dem Ziel, die von *tfda* kodierte 2,4-D-monoxygenase in diesen Organismen zur Expression zu bringen. Dabei kann es sich um Mikroorganismen handeln, aber auch höhere Organismen, wie z.B. Pflanzen, kommen dafür in Frage.

Die gezielte Übertragung von *tfda* auf andere Mikroorganismen bietet die Möglichkeit, das Spektrum der von diesen Organismen abbaubaren Substanzen zu erweitern. Für Bakterien ist die Übertragung und Expression von Genen des gesamten 2,4-D-Abbaus bereits in *J. Bacteriol.* 145:681 (1981) und in *Arch. Microbiol.* 134:92 (1983) beschrieben worden. Es wurde jedoch noch kein Versuch unternommen, ein isoliertes *tfda*-Gen in gramnegativen Bakterien wie *Pseudomonas* oder Alkaligenes zur Expression zu bringen.

Ebensowenig ist ein solcher Versuch für Pflanzen bekannt. Die Metabolisierung von 2,4-D durch einige Pflanzenarten wurde verschiedentlich berichtet (*Weed Science* 24:557 (1976) und z. *Pflanzenphysiol.* 110:395 (1983)). In niederen Konzentrationen wirkt diese Substanz als auxinanaologes Pflanzenhormon und wird deshalb in der Zellkulturtechnik verwendet, in höheren Konzentrationen wirkt es auf die Pflanzenzelle wie auch auf die Gesamtpflanze als Wuchshemmstoff, was seinen Einsatz als Herbizid begründet. In einer haploiden Zellsuspensionskultur von *Nicotiana silvestris* konnte durch Adaption an steigende Konzentrationen von 2,4-D eine Toleranz gegenüber diesem synthetischen Wuchsstoff erreicht werden, die auf einer erhöhten Metabolisierungsrate beruht (M.H. Zenk, 1974. *Haploids in physiological and biochemical research. In Haploids in higher plants. Advances and potential. Proceedings of the First International Symposium, Guelph, Ontario, Canada.* p339).

Da das Gen *tfda* die Abspaltung der Seitenkette von 2,4-D vermittelt, könnte die Fähigkeit, 2,4-D zu inaktivieren, mit Hilfe des aus Bakterien gewonnenen Gens auf all diejenigen Pflanzen übertragen werden, für die eine derartige gentechnische Manipulation möglich ist. Verfahren zur Übertragung fremder Gene auf Pflanzen und deren Nachkommenschaft sind heute bereits für einige Pflanzenarten erprobt (M. De Block, L. Herrera-Estrella, M. Van Montagu, J. Schell, and P. Zambryski. 1984. *Expression of foreign*

genes in regenerated plants and in their progeny. EMBO J. 3:1681 sowie R.D. Shillito, M.W. Saul, J. Paszkowski, M. Müller, and J. Potrykus, 1985. High efficiency direct gene transfer to plants. Bio/technology 3:1099 und werden in nächster Zeit eine breitere Anwendbarkeit erlangen.

In die genetische Transformation von Pflanzen werden große Hoffnungen gesetzt, insbesondere was die Erzeugung neuer, für den Menschen wichtiger Nutzpflanzen betrifft (J.L. Marx, 1985. Plant gene transfer becomes a fertile field. Science 230:11487. Mit dem Gen *tfda* stünde dafür eine neue genetisch übertragbare und *in vivo* selektierbare Eigenschaft in Form einer Toleranz gegenüber einem Wachstumshemmstoff zur Verfügung, wie sie bisher nur für wenige Antibiotika- bzw. Herbizidtoleranzen bekannt ist (R.T. Fraley et al. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803 und Nature 317:741 (1985)).

Die vorliegende Erfindung besteht zunächst darin, daß unter Anwendung eines an sich bekannten Mutationsverfahrens von einem Bakterienstamm, der 2,4-D als Wachstumssubstrat verwenden kann, wie z.B. *Alcaligenes eutrophus* JMP134, eine bisher nicht bekannte Mutante hergestellt wird, in welcher das Strukturen für die 2,4-D-monooxygenase inaktiviert ist. Diese Mutante wird unter Anwendung der bekannten Verfahren der DNA-Rekombination *in vitro*, der Transformation mit rekombinanter DNA und des konjugativen Transfers von DNA zur Selektion von rekombinanter DNA eingesetzt, welche *tfda* oder mit *tfda* im Wesentlichen identische Gene enthält.

Gegenstand der Erfindung sind Plasmide, die das Gen *tfda* oder mit *tfda* im Wesentlichen identische Gene enthalten, sowie Plasmide, welche Teile dieser Gene einschließlich der Promotorregion enthalten.

Die erfindungsgemäßen Plasmide können hergestellt werden, indem man DNA aus Wildtypbakterien, welche Gene für die Metabolisierung von 2,4-D oder 2,4-D-ähnlichen Verbindungen besitzen, mit Restriktionsendonukleasen verdaut und die entstandenen DNA-Fragmente mit Hilfe einer DNA-Ligase mit einem Plasmidvektor verknüpft, welcher zuvor durch das gleiche Restriktionsenzym in seine lineare Form umgewandelt worden ist.

Unter den so entstandenen rekombinanten Plasmiden können die erfindungsgemäßen *tfda*-haltigen Plasmide dadurch identifiziert werden, daß man die

Plasmide in Bakterienstämme bringt, aus denen dann die tfdA-haltigen Klone direkt aufgrund einer von tfdA vermittelten Fähigkeit selektiert werden können.

Solche Bakterienstämme besitzen die Eigenschaft, die in einer enzymatischen Reaktion in vivo von der 2,4-D-monoxygenase gebildeten Produkte, nicht jedoch deren Substrate als Kohlenstoff- und Energiequellen verwenden zu können.

Beispiele für Stämme mit der genannten Eigenschaft sind die erfindungsge-mäßen tfdA-Mutanten, in denen alle Gene für den Abbau von 2,4-Dichlor-phenol aktiv sind, ferner der Stamm *Alcaligenes eutrophus* JMP222, welcher Abbauwege für Phenol besitzt, sowie *Pseudomonas* sp. B13, der 4-Chlorphenol verwerten kann. Aber auch eine Reihe weiterer Bakterienstämme, welche ver-schieden substituierte Phenole abbauen können und vorwiegend in der Gruppe der gram-negativen Bakterien angetroffen werden, sind als Rezipienten zur Selektion und Identifizierung von klonierten tfdA-Genen vorstellbar.

Als Klonierungsvektoren werden bevorzugt Plasmide mit breitem Wirtsbereich verwendet, die in der Lage sind, sich auch in anderen Bakterienstämme als *E. coli* replikativ zu vermehren. Aber auch Plasmide, die ihre DNA oder Teile ihrer DNA durch Integration in das Genom der Wirtszelle weitervermehren können, kommen dafür in Frage.

Als Verfahren zur Einführung von DNA in die lebenden Zellen besagter Bakte-rienstämme eignet sich einmal die direkte Transformation dieser Stämme, so-fern Methoden dafür bekannt sind. So gibt es z.B. Transformationsverfahren für *Pseudomonas* und verwandte gramnegative Bakterien A.A. Mercer and J.S. Loutit. 1979. Transformation and transfection of *Pseudomonas aeruginosa*: effects of metal ions. *J. Bacteriol.* 140:37-42; A.M. Chakrabarty, J.R. Mylroie, D.A. Friello, and J.G. Vacca. 1975. Transformation of *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli* with plasmid-linked drug-resistance factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:3647-3651. Für alle gramnegativen Bak-terien anwendbar und wesentlich effektiver ist hingegen die Transformation eines *E. coli* Stammes nach einer literaturbekannten Methode mit anschließendem konjugativen Transfer der Plasmide in die betreffenden Bakterienstämme.

Für den konjugativen Transfer klonierter DNA werden bevorzugt mobilisierbare Plasmidvektoren verwendet. Die für den Transfer erforderlichen Gene werden dabei entweder von sogenannten Helperplasmiden oder von speziell dafür konstruierten mobilisierenden Stämmen zur Verfügung gestellt.

Aus den besagten Bakterienstämmen, welche direkt durch Selektion auf geeigneten Wachstumssubstraten gewonnen werden, oder aus Klonen von *E. coli*, welche durch das geschilderte Verfahren oder andere bekannte Testsysteme auf Expression von *tfda* identifiziert werden, lassen sich die *tfda* enthaltenden Plasmide nach bekannten Verfahren als eindeutig definierbare chemische Substanzen isolieren.

Der Vorteil der direkten Selektion *tfda*-haltiger Stämme durch Wachstumstest besteht vor allem darin, daß er im Gegensatz zu den bisher bekannten Verfahren, die alle auf relativ aufwendigen Enzymtests beruhen, die Identifizierung eines *tfda*-haltigen Plasmids unter einer sehr großen Anzahl verschiedener Plasmide ermöglicht, wie sie bevorzugt bei der Herstellung von Genbanken, d.h. der randomisierten Klonierung von DNA-Bruchstücken genomicscher DNA entstehen. Der Vorteil besteht damit in der breiten Anwendbarkeit des Verfahrens, denn Klonierung von *tfda*-Genen ist damit nicht mehr auf Wildtypstämme beschränkt, die das Gen *tfda* auf einem gut isolierbaren Plasmid tragen, sondern ist aus beinahe allen Wildtypstämmen möglich, auch solchen, die das Gen auf einem schlecht zugänglichen Plasmid oder dem Chromosom enthalten.

Die erfindungsgemäßen Plasmide werden erhalten, indem man z.B. das aus *Alcaligenes eutrophus* JMP134 stammende Plasmid pJP4, auf dem die Gene für den Abbau von 2,4-D liegen, mit der Restriktionsendonuklease HindIII schneidet, die entstandenen DNA-Fragmente elektrophoretisch trennt und die einzelnen isolierten Fragmente mit dem HindIII-geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pVK101 ligiert. Der mobilisierende Stamm *E. coli* S17-1 wird mit der rekombinanten DNA transformiert und plasmidhaltige Stämme werden auf tetracyclin-haltigem Medium selektiert. Aus Stämmen, welche durch Restriktionsanalyse identifizierte rekombinante Plasmide enthalten, wird die Plasmid-DNA durch Konjugation auf die oben erwähnte *tfda*-Mutante JMP134:Tn5-2 übertragen und die Expression des klonierten *tfda*-Gens durch Wachstum des Wirtsstammes auf 2,4-D-haltigem Minimalmedium nachgewiesen. Auf diese Weise kann das Plasmid pVJH21 identifiziert werden, welches das

Gen *tfda* auf einem 21 Kilobasen großen *HindIII*-Fragment, stammend aus *pJP4*, enthält. Durch Isolierung des Plasmids und anschließende Restriktionsanalyse kann die Identität des klonierten Fragments bestätigt werden.

Die erfindungsgemäßen Plasmide können außerdem durch Subklonieren aus rekombinanten Plasmiden hergestellt werden, die das Gen *tfda* enthalten. Dazu werden diese Plasmide mit einer oder mehreren Restriktionsendonukleasen verdaut und die entstandenen Bruchstücke werden mit Hilfe einer DNA-Ligase mit einem Vektorplasmid verknüpft, das mit den gleichen Restriktionsendonukleasen in seine lineare Form überführt worden ist. Aus den entstandenen Plasmiden können *tfda*-haltige auf die oben geschilderte Weise selektiert werden.

So kann z.B. das Plasmid *pGJS3* dadurch hergestellt werden, daß mit *SacI* erzeugte DNA-Fragmente des Plasmids *pVJH21* mit dem *SacI*-geschnittenen Vektorplasmid *pGSS33* verknüpft werden. Aus der Anzahl der neukombinierten Plasmide können solche selektiert werden, die ein intaktes *tfda*-Gen enthalten, indem die rekombinante Plasmid-DNA zuerst durch Transformation in den mobilisierenden Stamm *E. coli* *S17-1* und dann von dort durch Konjugation in die *tfda*-Mutante *JMP134:Tn5-2* überführt wird. Durch Selektion auf 2,4-D-haltigem Medium werden Plasmide identifiziert, welche ein 3 Kilobasen großes *SacI*-Insert enthalten, dessen Herkunft durch Restriktionsanalyse eindeutig auf das 21 Kilobasen große *HindIII*-Fragment aus *pVJH21* und damit auf *pJP4* zurückgeführt werden kann.

Durch Subklonieren von *tfda* enthaltenden DNA-Abschnitten können auch solche erfindungsgemäßen Plasmide hergestellt werden, die sich je nach dem verfolgten Anwendungsziel in der Art der verwendeten Plasmidvektoren unterscheiden.

So kann z.B. das 3 Kilobasen große *SacI*-Fragment aus *pGJS3* in den Vektor *pKT231* umkloniert werden, wobei die Plasmide *pKJS31* und *pKJS32* entstehen, die gegenüber *pGJS3* durch eine günstigere Restriktionskarte und die in vielen gram-negativen Bakterien gut exprimierte Kanamycin-Resistenz Vorteile für die weitere Charakterisierung von *tfda* bieten. Als Verfahren zum Nachweis der *tfda*-Expression durch von *pKT231* abgeleitete Plasmide, wie sie im Folgenden beschrieben werden, wird der konjugative Transfer aus *E. coli* *S17-1* in den Stamm *Alcaligenes eutrophus* *JMP222* mit anschließendem Test auf Verwertung von Phenoxyessigsäure als Wachstumssubstrat bevorzugt. Dieses

System bietet gegenüber den *tfda*-Mutanten die Vorteile, daß bei diesem Rezipientenstamm der konjugative Transfer mit höherer Effizienz stattfindet und mit der Kanamycin-Resistenz ein weiterer selektierbarer Marker zur Verfügung steht.

Durch Subklonieren können *tfda* enthaltende DNA-Fragmente auch in Expressionsvektoren eingebaut werden, auf denen *tfda*-Gene mit Hilfe eines fremden Promotors exprimiert werden.

So können z.B. das 2.8 Kilobasen große *SacI/SalI*-Fragment, das 2.0 Kilobasen große *BamHI/SalI*-Fragment und das 1.4 Kilobasen große *XbaI/SalI*-Fragment in die Expressionsvektoren *pT7-5* und *pT7-6* direkt im Anschluß an einen Phagenpromotor eingebaut werden, durch den die Genexpression mit Hilfe einer Promotor-spezifischen RNA-Polymerase gezielt angeschaltet werden kann. Das von den neu kombinierten Plasmiden *pTJS'035*, *pTJS'8435* und *pTJS'X535*, deren Herstellung in den Beispielen 8, 9 und 10 beschrieben wird, exprimierte *tfda*-Genprodukt kann durch spezifische Markierung mit radioaktivem Methionin und anschließende Gelelektrophorese identifiziert werden. Das System kann ferner dazu benutzt werden, in einem *E. coli*-Stamm große Mengen an 2,4-D-monooxygenase zu erzeugen, was die Reinigung und die anschließende proteinchemische und enzymatische Charakterisierung des Genprodukts im Vergleich zu seiner Isolierung aus dem Wildtypstamm wesentlich erleichtert, wodurch weitere biotechnologische Anwendungsmöglichkeiten erst erforschbar werden.

Die Subklonierung von *tfda* enthaltenden DNA-Fragmenten in Phagenvektoren vom Typ des M13-Phagen ermöglicht die Herstellung von Einzelstrang-DNA. Sie kann zur Bestimmung der Basensequenz nach dem Verfahren von Sanger *F. Sanger, S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463* eingesetzt werden, sie kann ferner zur gezielten Mutagenese einzelner Basen mittels Oligonukleotiden dienen, ein bekanntes Verfahren, das die Erzeugung von Restriktions-schnittstellen in einem Gen oder die Änderung der Aminosäureabfolge erlaubt. Die Einfügung von Restriktionsstellen in Genen erweitert deren Anwendungsmöglichkeiten, weil dadurch Schnittstellen für den Einbau von fremden Promotoren und die Verknüpfung von Genfragmenten zur Bildung von Fusionsproteinen geschaffen werden, wie sie z.B. für die Expression prokaryotischer Gene in Eukaryonten nötig sind.

Die Subklonierung des 2.8 Kilobasen großen SacI/SalI-Fragments aus pKJS32 in die Phagenvektoren M13tg130 und M13tg131, wie sie im Beispiel 16 beschrieben wird, stellt eine Möglichkeit dar, um das Gen tfdA für eine Sequenzierung zugänglich zu machen. Durch Modifikation der Doppelstrang-DNA der rekombinanten Phagen MJSS'030 und MJSS'031 können weitere Veränderungen an der Insert-DNA vorgenommen werden.

Die erfindungsgemäßen Plasmide können ferner durch Modifikation aus tfdA-haltigen Plasmiden hervorgehen. Durch Behandlung solcher Plasmide mit einer oder mehreren Restriktionsendonukleasen, eventueller Behandlung mit Exonukleasen und anschließender Wiederverknüpfung der DNA-Enden zu einem ringförmigen Molekül, erhält man deletierte, d.h. um einen bestimmten DNA-Abschnitt verkleinerte Plasmide, welche ein weiterhin intaktes tfdA-Gen enthalten können.

So ist es z.B. möglich, durch Entfernen von definierten DNA-Fragmenten aus den Plasmiden pKJS31 und pKJS32 das darin enthaltene 3 Kilobasen große Insert bis zu der XbaI-Schnittstelle auf der einen Seite und bis zu der SalI-Schnittstelle auf der anderen Seite zu verkleinern, ohne daß die Aktivität von tfdA dabei verloren geht. Die so erzeugten, in den Beispielen 4, 5 und 7 beschriebenen Plasmide pKJSB330, pKJS(X)630 und pKJS32RHAS' sind in der Lage, tfdA-Genaktivität zu exprimieren. Auf diese Weise kann die Lage des Gens auf ein 1.4 Kilobasen großes XbaI/SalI-Fragment eingegrenzt werden.

Durch die in Beispiel 16 beschriebene Deletion von verschiedenen langen DNA-Abschnitten aus den doppelsträngigen Formen der rekombinanten Phagen MJSS'030 und MJSS'031 mittels Exonuklease III, kann eine Reihe von Phagen erzeugt werden, bei denen jeweils verschiedene Bereiche der klonierten DNA dem Startpunkt für die Sequenzierung am nächsten liegen. Die Sequenz eines 2 Kilobasen großen BamHI/SalI-Fragments kann dann aus den überlappend sequenzierten Teilbereichen zusammengesetzt werden. Aus der Kenntnis der Basensequenz lassen sich dann weitere Eigenschaften der tfdA enthaltenden DNA ableiten, wie z. B. die Lage und Länge der kodierenden Region und die Lage von Restriktionsschnittstellen, was für die weitere Verwendung von tfdA von erheblichem Nutzen sein kann.

Durch Deletion von DNA-Fragmenten aus tfdA enthaltenden Plasmiden bzw. durch Subklonieren von DNA-Fragmenten können auch weitere erfindungsgemäße Plasmide erhalten werden, die nur noch Teile eines tfdA-Gens enthalten. So entsteht z.B. durch Subklonieren des 1.5 Kilobasen großen EcoRI/BamHI-Fragments aus pKJS32 in pKT231 das Plasmid pKJEAB130, das nur noch das 5'-Ende von tfdA, d.h. den Promotor und die für den N-Terminus kodierende Sequenz, enthält und das nicht mehr zur Expression eines enzymatisch aktiven Genprodukts befähigt ist. Teile von Genen können zur Konstruktion von Plasmiden Verwendung finden, bei denen das 5'-Ende einer kodierenden DNA einschließlich deren Promotor im gleichen Leseraster mit dem 3'-Ende einer anderen kodierenden DNA verknüpft sind und die somit zur Expression eines sogenannten Fusionsproteins in denjenigen Organismen führen, die den jeweiligen Promotor erkennen.

Eine weitere Möglichkeit der Modifikation der erfindungsgemäßen Plasmide besteht in der Insertion eines fremden DNA-Segments. Die Insertion kann zur Einfügung neuer funktioneller DNA-Sequenzen dienen, z.B. von Restriktions-schnittstellen, Promotoren, Resistenzgenen, Translations- und Transkriptionsstopsignalen. Die Insertion eines Teils einer fremden Gensequenz kann auch zur Bildung von Fusionsproteinen führen.

Ein Beispiel für die Insertion einer fremden DNA ist die Insertion des Omega-Fragments in die BgIII-Schnittstelle des Plasmids pTJS'X535, die inmitten der kodierenden Region von tfdA gelegen ist (Beispiel 11). Mit diesem Fragment werden Translations-Stopkodons in allen Leserastern und Transkriptions-Stopsignale zusammen mit einer selektierbaren Antibiotikaresistenz eingebaut. Wie durch spezifische radioaktive Markierung des Genprodukts sowie durch in vivo Enzymetest auf 2,4-D-monoxygenase (Beispiel 15) nachgewiesen werden kann, führt dies zur Expression eines verkürzten, nicht mehr enzymatisch aktiven Proteins durch das rekombinante Plasmid pTJS'X535omega.

Klonierte Fragmente, die tfdA oder Teile von tfdA enthalten, können zur Detektion homologer DNA-Sequenzen und damit zum Auffinden von tfdA-Genen in anderen Organismen dienen. Dazu werden diese Fragmente aus den erfindungsgemäßen Plasmiden mit Hilfe geeigneter Restriktionsenzyme herausgeschnitten, isoliert und nach literaturbekannten Methoden z.B. durch Radionuklideinbau

markiert. Durch das bekannte Verfahren der Hybridisierung können in der gesamten DNA eines Organismus oder in einer daraus hergestellten Genbank Fragmente identifiziert werden, die eine Homologie mit tfdA aufweisen. Auf diese Weise können auch unter einer Population verschiedener Organismen jene erkannt werden, die eine solche mit tfdA homologe Sequenz enthalten. Das Verfahren kann zum Aufspüren neuer 2,4-D abbauender Organismen sowie zum Auffinden von tfdA-Genen in diesen Organismen verwendet werden.

tfdA-Gene können entweder direkt mit Hilfe der erfundungsgemäßen Plasmide, soweit sie dafür geeignet sind, oder nach Veränderung mittels bekannter Verfahren der Gentechnik auf andere Organismen übertragen werden. Die Übertragung kann den Zweck verfolgen, die von tfdA kodierte 2,4-D-mono-oxygenase in diesen Organismen zu exprimieren und diesen damit die Eigenschaft zu verschaffen, 2,4-D oder 2,4-D-ähnliche Substanzen abbauen zu können.

So ist es z.B. möglich, durch den in Beispiel 14 beschriebenen konjugativen Transfer tfdA-haltiger Plasmide mit breitem Wirtsbereich in verschiedene gram-negative Bakterien diesen die Fähigkeit zu verleihen, 2,4-D oder 2,4-D-ähnliche Substanzen zu dem korrespondierenden Phenol umzusetzen. In Verbindung mit einer dem jeweiligen Stamm eigenen Abbauleistung kann dies zu einer Erweiterung des Spektrums der von diesem Stamm abbaubaren Verbindungen führen. Der Stamm Alcaligenes eutrophus JMP222 besitzt z.B. Gene für die Metabolisierung von Phenol. Die Expression von tfdA vermittelt ihm somit die völlig neue Möglichkeit, Phenoxyessigsäure als Wachstumssubstrat zu nutzen. Der Stamm Pseudomonas B13 kann sowohl Phenol als auch 4-Chlorphenol metabolisieren, und erhält durch tfdA auf analoge Weise die Fähigkeit zum Wachstum auf Phenoxyessigsäure und 4-Chlorphenoxyessigsäure. Ebenso ist der Abbau verschieden substituierter Phenoxyessigsäuren wie 4-Chlor-2-methylphenoxyessigsäure, 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure und ähnlicher Verbindungen durch Organismen denkbar, welche tfdA enthalten und die korrespondierenden Phenole umsetzen können. Wenn die damit erreichbare Erweiterung des Spektrums der Abbauleistungen eines Organismus auch nicht in jedem Falle zur Schaffung einer neuen, in der Natur bisher nicht verwirklichten Eigenschaft führt, so kann sie doch zu einer qualitativen Verbesserung dienen, insofern als damit Stämme mit einer im Vergleich zu Wildtypstämmen höheren Abbauleistung konstruiert werden können, oder solche mit einer höheren Toleranz gegenüber möglicherweise toxischen Substraten

oder Produkten eines Abbauweges. Solche Stämme würden sich speziell unter Bedingungen als nützlich erweisen, wie sie nicht in natürlicher Umgebung, sondern in künstlichen Systemen wie z.B. in Kläranlagen zur Reinigung industrieller Abwässer vorherrschen. Eine Übersicht über die bisher auf dem Gebiet des mikrobiellen Abbaus halogenierter aromatischer Verbindungen mit Hilfe neukonstruierter Stämme erreichbaren Leistungen wurde kürzlich veröffentlicht (D. Ghosal, I.-S. You, D.K. Chatterjee, A.M. Chakrabarty, 1985. Microbial degradation of halogenated compounds. *Science* 228:135-142).

Eine weitere Verwendungsmöglichkeit für das Gen *tfda* stellt seine Übertragung auf Pflanzen dar. Methoden zur Transformation von Pflanzen mit fremder DNA sind in der Literatur bekannt und erprobt. Bisher sind im Wesentlichen zwei Verfahren zu unterscheiden: Die eine bedient sich der Funktionen des Ti-Plasmids aus *Agrobacterium tumefaciens*, die andere basiert auf der Transformation pflanzlicher Protoplasten unter Zuhilfenahme physikalischer und chemischer Agentien wie Elektroporation, Hitzeschock, Kalziumchlorid- oder Polyethylenglykolbehandlung. Während die Transformation pflanzlicher Zellen durch die eine oder andere Methode prinzipiell immer möglich ist, gelingt nicht in jedem Fall die Regeneration ganzer Pflanzen aus einzelnen Zellen oder Zellgeweben. Dies stellt im Moment das Haupthindernis für die gentechnische Manipulation von monokotylen Pflanzen dar.

Bevorzugtes Ziel der Transformation von Pflanzen mit *tfda* ist die Expression der Geneigenschaft, d.h. der 2,4-D-monooxygenase-Aktivität in der transformierten Pflanze. Die Pflanze wäre damit in der Lage, die in niedrigen Konzentrationen als auxinanaologes Pflanzenhormon und in hohen Konzentrationen als Wuchshemmstoff wirkenden Derivate der Phenoxyessigsäure zu den phytochemisch unwirksamen Phenolen abzubauen. Somit könnte dieser Eigenschaft eine Bedeutung als selektierbarer Marker für genetisch transformierte Pflanzen zu.

Damit ein prokaryotisches Gen wie *tfda* in Pflanzenzellen exprimiert werden kann, muß es mit den für die Transkription und die Translation notwendigen pflanzenspezifischen Signalsequenzen gekoppelt sein. Es sind Hinweise bekannt, daß diese Koppelung durch die zufallsgesteuerte Integration eines Gens in das Genom einer damit transformierten Pflanze stattfinden kann. Prokaryotische Gene werden jedoch bevorzugt in vitro mit den geeigneten pflanzenspezifischen Expressionssignalen kombiniert. Ein allgemein anwend-

bares Verfahren besteht z.B. darin, daß das 5'-Ende eines Strukturgens einschließlich des dazugehörigen pflanzlichen Promoters mit der kodierenden Sequenz des prokaryotischen Gens in der Weise verknüpft wird, daß in einer damit transformierten Pflanzenzelle ein Fusionsprotein synthetisiert wird, das aus den N-terminalen Aminosäuren des Pflanzenproteins und einem überwiegenden Anteil des prokaryotischen Proteins besteht und das in seinen wesentlichen Eigenschaften dem prokaryotischen Protein gleicht [R.T. Fraley et al. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803, J. Paszkowski, and M.W. Saul, 1986. Direct gene transfer to plants. In S.P. Colowick and N.A. Kaplan (ed.), Methods in Enzymology 118:668]. Eine ähnliche Methode verwendet nur den pflanzlichen Promotor einschließlich eines Teils der 5'-untranskribierten Region der transkribierten m-RNA und verzichtet auf das 5'-Ende der kodierenden Region eines pflanzlichen Gens. Bei der Expression in Pflanzen dient dann ein ATG-Kodon des prokaryotischen Genteils als Start für die Translation. In analoger Weise lassen sich die Expressionssignale von Pflanzenviren verwenden [N. Brisson, and T. Hohn. 1986, Plant virus vectors; cauliflower mosaic virus. In S. P. Colowick and N. O. Kaplan (ed.), Methods in Enzymology 118:659]. Vektoren für die Expression prokaryotischer Gene in Pflanzen sind literaturbekannt und stehen allgemein zur Verfügung.

Voraussetzung für die Konstruktion eines in Pflanzen exprimierbaren Gens aus einem prokaryotischen Gen mit Hilfe der genannten Vektorplasmide ist die Kenntnis der Basensequenz, wie sie für das Gen *tfdA* vorliegt. Sie erlaubt die exakte Lokalisation von Restriktionsschnittstellen und ermöglicht damit die basengenaue Verknüpfung der verschiedenen DNA-Segmente. Ferner ermöglicht sie erst die gezielte Mutagenese zur Schaffung neuer funktionell wichtiger DNA-Sequenzen, wie z.B. die Einführung von neuen Restriktions-schnittstellen.

Im Nachstehenden wird die Erfindung an Hand von Zeichnungen und Beispielen näher erläutert. In den Beispielen wurden in der Fachwelt allgemein bekannte und erprobte Methoden der Gentechnik benutzt. Die Klonierung von Genen und die Analyse von Genstrukturen wurden nach den genterotechnischen Standardverfahren durchgeführt, die bereits Eingang in die Lehrbücher von E.-L. Winnacker (Gene und Klone, Verlag Chemie, Weinheim, 1985) und von R. W. Old und S.B. Primrose (Principles of gene manipulation, Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1985) gefunden haben. In I.K. Setlow und A. Hollaender (Genetic engineering: principles and methods. Plenum Publ. Corp., N.Y.) z.B. werden die Methoden und Techniken jeweils auf den neuesten

Stand gebracht. Neben den speziellen Veröffentlichungen wurden vielfach auch allgemeine Arbeitsvorschriften in Form von Laborhandbüchern (R.W. Davis et al., Advanced bacterial genetics: a manual for genetic engineering, T. Maniatis et al., Molecular cloning; T.J. Silhavy et al., Experiments with gene fusions, alle aus Cold Spring Harbour Lab., N.Y.; A. Pühler and K.N. Timmis, Advanced molecular genetics, Springer, Berlin, 1984; D.M. Glover, DNA cloning: a practical approach, JRL Press, Oxford, Washington, D.C., 1985) herangezogen.

Am 28. August 1986 wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) in Göttingen, Bundesrepublik Deutschland, folgende Mikroorganismen hinterlegt (Hinterlegungsnummer):

E. coli HMS 174 (pT7-5)	(DSM 3829)
E. coli HMS 174 (pT7-6)	(DSM 3830)
E. coli JA 221 (pGSS33)	(DSM 3831)
E. coli LE 392 (pTJSS'035)	(DSM 3832)
E. coli HB101 (pVK101)	(DSM 3833)
E. coli SK1592 (pKT231)	(DSM 3834)
E. coli S17-1 (pKJS31)	(DSM 3835)
E. coli S17-1 (pKJS32 RHΔS')	(DSM 3836)
E. coli S17-1 (pKJS(X)630)	(DSM 3837)
E. coli SBC107 (pRME1)	(DSM 3838)
E. coli K38 (pGT1-2/pTJS'X535)	(DSM 3839)
Alcaligenes eutrophus JMP134 (pJP4)	(DSM 3840)
Alcaligenes eutrophus JMP222	(DSM 3841)
Alcaligenes eutrophus JMP134:Tn5-2 (pJP4:Tn5-2)	(DSM 3842)
Alcaligenes eutrophus JMP134:Tn5-4 (pJP4:Tn5-4)	(DSM 3843)

Beschreibung der Abbildungen:

Abkürzungen:

Ap - Ampicillinresistenz
 Km - Kanamycinresistenz
 kb - Kilobasen
 M - Molekulargewichtsmarker
 kD - Kilodalton

Abbildungen:

Abb. 1 - zeigt die Herkunft und die Restriktionskarte des 21 kb großen, aus pJP4 klonierten HindIII-Fragments (Beispiel 1) und der davon abgeleiteten Subfragmente (Beispiel 3 bis 7), sowie die Expression des Phenoxyessigsäure-abbaus in Alcaligenes eutrophus JMP222 durch die entsprechenden Plasmide mit breitem Wirtsbereich (Beispiel 14). Der Pfeil markiert die genaue Lage von tfdA im Plasmid pJP4.

Abb. 2, 3, 4 - zeigen die von pKT231 abgeleiteten Plasmide, die tfdA oder Teile von tfdA enthalten (Beispiele 3 bis 7). Die dünnen Linien bezeichnen den vom Vektorplasmid stammenden Anteil, die dicken Linien bezeichnen das aus pJP4 stammende Insert.

Abb. 5, 6, 7 - zeigen die von den T7-Promotorplasmiden pT7-5 und pT7-6 abgeleiteten Plasmide mit tfdA enthaltenden Insertfragmenten (Beispiele 8 bis 11). Die dünnen Linien bezeichnen den vom Vektorplasmid stammenden Anteil, die dicken Linien bezeichnen das aus pJP4 stammende Insert.

Abb. 7 b - zeigt die Insertion des Omegafragments in das Plasmid pTJS'X535 (Beispiel 11).

Abb. 8 - zeigt spezifisch radioaktiv markierte Proteine auf dem Autoradiogramm eines Polyacrylamidgels, die von den tfdA enthaltenden Plasmiden mit Hilfe des T7-Promotors in hoher Ausbeute exprimiert werden (Beispiel 15). 1: pTJS'035, 2: pTJS'B435, 3: pTJS'X535, 4: pTJS'036, 5: pTJS'B436, 6: pTJS'X536. a bezeichnet vollständig

markiertes Gesamtzellprotein, b bezeichnet nach Induktion des T7-Promotors spezifisch markiertes Protein.

Abb. 9

- zeigt das von Plasmid pTJS'X535omega mit Hilfe des T7-Promotors exprimierte, verkürzte tfdA-Genprodukt (2b) im Vergleich zum unverkürzten, von pTJS'X535 exprimierten Protein (3b) und zum insertfreien Vektorplasmid pT7-5 (1b). a bezeichnet vollständig markiertes Gesamtzellprotein, b bezeichnet nach Induktion des T7-Promotors spezifisch markiertes Protein.

Abb. 10

- zeigt die Basensequenz des 2058 Basen langen BamHI/SalI-Fragments, auf dem das Gen tfdA vom 5'-Ende zum 3'-Ende hin transkribiert wird. Die Pfeile bezeichnen den Anfang und das Ende der kodierenden Region von tfdA (Beispiel 16).

ERSATZBLATT

Beispiel 1: Herstellung des Plasmids pVJH21

a) Isolierung der Plasmide pJP4 und pVK101

Alcaligenes eutrophaus JMP134 wird in 250 ml PYF-Medium (Pepton, 3 g/l; Hefeextrakt, 3 g/l; Fructose, 2 g/l) 16 Stunden bei 30 °C angezogen. Aus den abzentrifugierten Zellen wird das Plasmid pJP4 nach dem Verfahren aus J. Bacteriol. 135:227 (1978) isoliert. Das Plasmid pVK101 [V.C.Knauf et al., Plasmid 8:45 (1982)] wird aus E. coli HB101 nach dem allgemein bekannten Verfahren der alkalischen Lyse von T. Maniatis et al. (Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York, 1982) isoliert.

b) Klonierung des 21 Kilobasen HindIII-Fragments aus pJP4

Eine Reaktionsmischung, bestehend aus 20 µl (500 ng) pJP4, 2.5 µl TAS-Puffer (0.33 M Tris-acetat, 0.65 M Kaliumacetat, 0.1 M Magnesiumacetat, 5 mM Dithiothreitol (DTT), 30 mM Spermidin, pH 7.9) und 2.5 µl (1 Unit) einer verdünnten HindIII-Lösung, werden 120 min bei 37 °C inkubiert. Eine weitere Reaktionsmischung, bestehend aus 50 µl (14 µg) pVK101, 5.5 µl TAS-Puffer und 1 µl (20 Units) unverdünnter HindIII-Lösung, werden 90 min bei 37 °C inkubiert, danach wird 1 µl (30 Units) Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (DIP, Boehringer Mannheim) zugesetzt und weitere 60 min inkubiert. 9 µl von jeder der beiden Reaktionsmischungen werden auf einem 0.7%igen Low-Melting-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wird anschließend 15 min in einer Ethidiumbromidlösung (5 µg/ml) gefärbt und die DNA-Banden im UV 300nm sichtbar gemacht. Die einzelne 20 kb Bande der pVK101-Restriktion sowie die zweitgrößte Bande (21 kb) der pJP4-Restriktion werden aus dem Gel ausgeschnitten, beide Banden werden vereinigt, und die DNA wird aus der Agarose nach dem Verfahren von T. Maniatis et al. (Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York, 1982) isoliert. Die ethanolgefällte DNA wird in 10 µl Ligationspuffer (66 mM Tris-HCl, 6.6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, pH 7.5) aufgenommen, mit 1 µl (0.1 Unit) verdünnter T4-DNA-Ligase versetzt und 16 Stunden bei 14 °C inkubiert (=Ligationsansatz). Kompetente Zellen von E. coli S17-1 [Biotechnology 1:784 (1983)] werden nach dem Verfahren von T.J. Silhavy et al. (Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York, 1984) hergestellt. 0.2 ml der so gewonnenen kompetenten Zellen werden mit 5 µl Ligationsansatz gemischt, 40 min auf Eis belassen, dann 3 min auf 42 °C erhitzt (=Transformation), anschließend mit

2 ml LB-Medium nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) verdünnt und 60 min bei 30 °C inkubiert (= phänotypische Expression). Danach werden Portionen von je 0.2 ml auf LB-Agar-Platten, enthaltend 10 µl/ml Tetracyclin, ausgestrichen. Die Platten werden 16 Stunden bei 37 °C bebrütet. Es zeigen sich mehrere Tetracyclin-resistente Kolonien.

c) Identifizierung von pVJH2

Aus den so gewonnenen Tetracyclin-resistenten Kolonien wird nach dem Verfahren der alkalischen Lyse eine Schnellpräparation der Plasmid-DNA durchgeführt, wie sie von T. Maniatis et al. beschrieben wird. Durch das oben beschriebene Verfahren der Behandlung mit alkalischer Phosphatase wird gewährleistet, daß jeder der Tetracyclin-resistenten Klone das gewünschte Insert enthält. Durch Restriktionsenzymverdauung mit EcoRI und anschließender elektrophoretischer Trennung der DNA-Fragmente in einem 0.7%igen Agarosegel nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) werden die rekombinanten Plasmide identifiziert. Durch Vergleich der Größen der erhaltenen EcoRI-Fragmente mit den Größenverhältnissen, die bezüglich EcoRI und HindIII für pJP4 und pVK101 aus der Literatur bekannt sind [R.H. Don, J. Bacteriol. 161:466 (1985) und V.C. Knauf et al. Plasmid 8:45 (1982)], gelingt eine genaue Identifizierung der Insert-DNA sowie seiner Orientierung im Vektorplasmid pVK101.

d) Restriktionskarte des HindIII-Inserts in pVJH21

Ein so gewonnener Stamm, der das Plasmid pVJH21 enthält, wird in 400 ml LB-Medium, das 20 µg/ml Tetracyclin enthält, 16 Stunden bei 37 °C angezogen. Aus den abzentrifugierten Zellen wird die Plasmid-DNA nach der Methode der alkalischen Lyse nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) isoliert. Die isolierte Plasmid-DNA von pVJH21 wird in verschiedenen Ansätzen mit den Enzymen EcoRI, BamHI und SacI einzeln, sowie mit folgenden 9 Kombinationen mehrerer Enzyme verdaut: EcoRI/BamHI (1), EcoRI/SacI (2), BamHI/SacI (3), HindIII/EcoRI (4), HindIII/BamHI (5), HindIII/SacI (6), HindIII/EcoRI/BamHI (7), HindIII/EcoRI/SacI (8) und HindIII/BamHI/SacI (9). Die DNA-Fragmente werden in einem 0.7%igen Agarosegel nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) aufgetrennt und ihre Größen werden durch Vergleich mit HindIII-geschnittener lambda-DNA ermittelt. Mit den daraus gewonnenen Daten wird zusammen mit den für die Plasmide pJP4 [R.H. Don, J. Bacteriol. 161:466 (1985)] und pVK101 [V.C. Knauf et al. Plasmid 8:45 (1982)] bezüglich EcoRI, BamHI und HindIII bekannten Größenverhältnissen die Restriktionskarte erstellt.

Beispiel 2: Herstellung des Plasmids pGJS3

a) Isolierung der Plasmide pVJH21 und pGSS33

Der rekombinante Stamm *E. coli* S17-1, der das in Beispiel 1 hergestellte Plasmid pVJH21 enthält, und *E. coli* JA221 mit dem Vektorplasmid pGSS33 [G.S. Sharpe Gene 29:93 (1984)] werden in je 300 ml LB-Medium, das 20 µg/ml Tetracyclin enthält, 16 Stunden bei 37 °C angezogen. Aus den abzentrifugierten Zellen werden die beiden Plasmide nach der Methode der alkalischen Lyse nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) isoliert.

b) Klonierung von SacI-Fragmenten aus pVJH21

Eine Reaktionsmischung, bestehend aus 10 µl (5 µg) pVJH21, 10 µl (1 µg) pGSS33, 4 µl TAS-Puffer, 16 µl Wasser und 0.5 µl (10 Units) SacI, wird 90 min bei 37 °C inkubiert. Das Restriktionsezym wird anschließend durch 15 minütiges Erhitzen auf 68 °C inaktiviert. Die DNA wird mit Ethanol gefällt nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) und der getrocknete Niederschlag in 40 µl Ligationspuffer aufgenommen. Nach Zusatz von 1 µl (1 Unit) T4-DNA-Ligase wird der Ligationsansatz 16 Stunden bei 14 °C inkubiert. *E. coli* LE392 [N.E. Murray et al. Mol. Gen. Genet. 150:53 (1977)] wird nach dem Verfahren von T.J. Silhavy et al. (Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour, New York, 1984) für die DNA-Aufnahme kompetent gemacht, 0.2 ml kompetente Zellen werden mit 5 µl Ligationsansatz gemischt, 40 min auf Eis belassen und durch 3minütiges Erhitzen auf 42 °C transformiert. Nach Verdünnen mit 2 ml LB-Medium und Inkubation bei 30 °C werden Portionen von 50 µl bis 200 µl auf LB-Agar-Platten, die 20 µg/ml Chloramphenicol enthalten, ausgestrichen. Die Platten werden 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

c) Identifizierung rekombinanter Plasmide

Die so erhaltenen Chloramphenicol-resistenten Kone werden parallel auf zwei LB-Agar-Platten ausgestrichen, wovon eine 25 µg/ml Streptomycin, die andere 20 µg/ml Chloramphenicol enthält. Aus Klonen, die sich bei diesem Test als Streptomycin-sensitiv erweisen, wird die Plasmid-DNA mit Hilfe des Schnellverfahrens der alkalischen Lyse nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) isoliert. Durch Restriktion der isolierten Plasmide mit SacI, elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente auf einem 0.7%igen Agarosegel und Vergleich der im UV 300 nm sichtbaren Banden mit bekannten Fragmenten einer HindIII-Restriktion der lambda-Phagen-DNA wird die Größe der im Vektor pVK101

enthalteten Inserts ermittelt. Bei dem Plasmid pGJS3 handelt es sich um ein rekombinantes Plasmid aus pGSS33 und einem 3 Kilobasen großen DNA-Fragment. Da das Plasmid pVK101 selbst keine Schnittstelle für SacI besitzt, stammt das klonierte DNA-Fragment eindeutig aus dem 21 Kilobasen großen HindIII-Fragment von PJP4.

Beispiel 3: Herstellung der Plasmide pKJS31 und pKJS32

a) Isolierung der Plasmide pGJS3 und pKT231

Der in Beispiel 2 hergestellte Stamm *E. coli* LE392, der das rekombinante Plasmid pGJS3 enthält, wird in 400 ml LB-Medium mit einem Zusatz von 20 µg/ml Chloramphenicol 16 Stunden bei 37 °C angezogen. *E. coli* SK1592 mit dem Vektorplasmid pKT231 [M. Bagdasarian et al., Current Topics in Microbiology and Immunology 96:47 (1982)] wird in 400 ml LB-Medium mit einem Zusatz von 50 µg/ml Kanamycin unter den gleichen Bedingungen angezogen. Aus den abzentrifugierten Zellen werden die beiden Plasmide nach dem Verfahren der alkalischen Lyse nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) isoliert.

b) Umklonierung des SacI-Fragmentes aus pGJS3 in pKT231

Eine Reaktionsmischung, bestehend aus 40 µl (400 ng) pGJS3, 4 µl (100 ng) pKT231, 6 µl TAS-Puffer, 9 µl Wasser und 1 µl (1 Unit) verdünnte SacI-Lösung, werden 120 min bei 37 °C inkubiert. Durch anschließendes Erhitzen der Reaktionsmischung auf 68 °C für 15 min werden die Restriktionsenzyme inaktiviert. Zu dem Ansatz werden 39 µl Wasser, 10 µl 10-fach konzentrierter Ligationspuffer und 1 µl (0.1 Unit) einer verdünnten T4-DNA-Ligase hinzugefügt und der Ligationsansatz 16 Stunden bei 14 °C inkubiert. 0.2 ml kompetente Zellen von *E. coli* LE392, hergestellt nach dem Verfahren von T.J. Silhavy et al. (Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York, 1984), werden mit 10 µl des Ligationsansatzes gemischt, 40 min auf Eis belassen, 3 min auf 42 °C erhitzt, mit 2 ml LB-Medium gemischt und 60 min bei 37 °C inkubiert. Portionen von 50 µl bis 200 µl werden auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, die 50 µg/ml Kanamycin enthalten. Die Platten werden 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

c) Identifizierung der rekombinanten Plasmide

Die so erhaltenen Kanamycin-resistenten Klone werden parallel auf drei verschiedenen LB-Agar-Platten ausgestrichen, wovon eine 25 µg/ml Streptomycin, die zweite 20 µg/ml Chloramphenicol und die dritte 50 µg/ml Kanamycin enthält. Klone, die sich in diesem Test als Streptomycin- und

Chloramphenicol-sensitiv, aber als Kanamycin-resistant erweisen, enthalten im Regelfalle ein rekombinantes Plasmid aus dem Vektor pKT231 (Kanamycin-resistenz) und dem 3 Kilobasen großen SacI-Fragment aus pGJS3. Durch Isolierung der Plasmid-DNA nach dem bekannten Schnellverfahren nach T. Maniatis et al. (vgl. oben), Restriktion der DNA mit SacI und anschließender Analyse der Fragmente durch Elektrophorese in einem 0.7%igen Agarosegel wird die Größe der inserierten DNA bestimmt. Durch eine in gleicher Weise ausgeführte Restriktionsanalyse mit EcoRI werden Plasmide mit unterschiedlicher Orientierung des Inserts in Relation zum Vektorplasmid identifiziert. Bei dem Plasmid pKJS32 handelt es sich um diejenige Form der beiden Möglichkeiten, bei der die EcoRI-Stelle des Inserts am nahesten bei der EcoRI-Stelle des Vektoranteils liegt. Dieses Plasmid ergibt zwei EcoRI-Fragmente der Größen 0.9 und 15 Kilobasen. Das Plasmid pKJS31 stellt die Konstruktion mit der entgegengesetzten Orientierung des Inserts dar, es liefert zwei EcoRI-Fragmente der Größen 2.3 und 13.5 Kilobasen.

Beispiel 4: Herstellung des Plasmids pKJSB330

a) Isolierung des Plasmids pKJS31

Der in Beispiel 3 erhaltene Klon von *E. coli* LE392, der das neu kombinierte Plasmid pKJS31 enthält, wird in 400 ml LB-Medium mit einem Zusatz von 50 µg/ml Kanamycin 16 Stunden bei 37 °C angezogen und aus den abzentrifugierten Zellen wird die Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) isoliert.

b) Deletion des kleineren BamHI-Fragments aus pKJS31

Eine Reaktionsmischung, bestehend aus 10 µl (500 ng) pKJS31, 7 µl Wasser, 2 µl TAS-Puffer und 1 µl (1 Unit) einer verdünnten BamHI-Lösung, wird 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die enzymatische Reaktion durch Erhitzen auf 68 °C für 15 min gestoppt. Der Restriktionsansatz wird dann mit 50 µl Wasser, 8 µl 10-fach konzentriertem Ligationspuffer und 2 µl (2 Units) T4-DNA-Ligase versetzt und 16 Stunden bei 14 °C inkubiert. 0.2 ml kompetente Zellen von *E. coli* S17-1, hergestellt nach dem bekannten Verfahren von T.J. Silhavy et al. (Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York, 1984), werden mit 10 µl des Ligationsansatzes gemischt, 40 min auf Eis belassen, 3 min auf 42 °C erhitzt, mit 2 ml LB-Medium gemischt und 60 min bei 37 °C inkubiert. Portionen von 50 µl bis 200 µl werden auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, die 50 µg/ml Kanamycin

enthalten. Die Platten werden 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

c) Identifizierung der verkleinerten Plasmide

Aus den so erhaltenen Kanamycin-resistenten Klonen wird die Plasmid-DNA mittels des bekannten Schnellverfahrens der alkalischen Lyse nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) isoliert. Durch Restriktion der Plasmide mit BglII und elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente in einem 0.7%igen Agarosegel werden Plasmide identifiziert, die das kleine BamHI-Fragment aus pKJS31 verloren haben. Diese Plasmide besitzen nur eine einzige BglII-Schnittstelle und liefern daher ein BglII-Fragment von 13.2 Kilobasen Größe. Sie lassen sich damit eindeutig von ihrem Ursprungsplasmid pKJS31 unterscheiden und werden als pKJSB330 bezeichnet.

Beispiel 5: Herstellung des Plasmids pKJS32RH4S

a) Isolierung der Plasmide pKJS32 und pRME1

Der in Beispiel 3 erhaltene Klon von *E. coli* LE392, der das neukombinierte Plasmid pKJS32 enthält, sowie *E. coli* SBC107 (pRME1) werden in je 400 ml LB-Medium mit einem Zusatz von 50 µg/ml Kanamycin 16 Stunden bei 37 °C angezogen. Aus den abzentrifugierten Zellen werden die Plasmide mittels alkalischer Lyse nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) isoliert.

b) Deletion eines HindIII/SalI-Fragmentes aus pKJS32 und anschließende Insertion eines HindIII/SalI-Fragmentes aus pRME1

Eine Reaktionsmischung, bestehend aus 10 µl (500 ng) pKJS32, 10 µl (1 µg) pRME1, 15 µl Wasser, 4 µl TAS-Puffer, 0.5 µl (1 Unit) verdünnter HindIII-Lösung und 0.5 µl (1 Unit) verdünnter SalI-Lösung, werden 120 min bei 37 °C inkubiert und die enzymatische Reaktion durch Erhitzen auf 68 °C für 15 min gestoppt. Anschließend werden 10 µl des Restriktionsansatzes mit 25 µl Wasser, 4 µl 10-fach konzentriertem Ligationspuffer und 1 µl (1 Unit) T4-DNA-Ligase versetzt und 16 Stunden bei 14 °C inkubiert. Nach einem bekannten Verfahren T.J. Silhavy et al. (Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York, 1984), kompetent gemachte Zellen von *E. coli* S17-1 werden mit 10 µl des Ligationsansatzes gemischt, 40 min auf Eis belassen, 3 min auf 42 °C erhitzt und nach Vermischen mit 2 ml LB-Medium 60 min bei LB-Agar-Platten ausgestrichen, die 50 µg/ml Kanamycin enthalten.

Die Platten werden 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

c) Identifizierung der rekombinanten Plasmide

Aus den so erhaltenen Kanamycin-resistenten Klonen wird die Plasmid-DNA mittels des bekannten Schnellverfahrens der alkalischen Lyse nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) isoliert. Durch Restriktion mit BamHI und elektrophoretischer Auftrennung der erhaltenen DNA-Fragmente werden Plasmide identifiziert, bei denen ausgehend von pKJS32 der kleinere DNA-Abschnitt zwischen der auf dem Vektoranteil inmitten des Kanamycin-Resistenzgens gelegenen HindIII-Schnittstelle und der auf dem Insert gelegenen SalI-Schnittstelle entfernt worden ist und durch dasjenige HindIII/SalI-Fragment aus pRME1 ersetzt worden ist, welches das 3'-Ende der kodierenden Region des Kanamycin-Resistenzgens trägt. Diese Plasmide liefern zwei BamHI-Fragmente mit den Längen 13.3 und 2.0 Kilobasen und unterscheiden sich damit eindeutig von den Ausgangsprodukten und anderen möglichen Nebenprodukten der Ligation. Sie stellen Konstruktionen dar, bei denen ein 0,2 Kilobasen großer DNA-Abschnitt des 3.0 Kilobasen großen Inserts von pKJS32 entfernt wurde und bei denen ein Teil des Kanamycinresistenzgens gegen ein anderes Genfragment des gleichen genetischen Ursprungs ausgetauscht wurde. Diese Plasmide werden als pKJS32RHAS' bezeichnet.

Beispiel 6: Herstellung des Plasmids pKJE4B130

a) Isolierung der Plasmide pKT231 und pKJS32

Die Isolierung von pKT231 wurde in Beispiel 3, die von pKJS32 in Beispiel 5 beschrieben.

b) Klonierung des kleineren EcoRI/BamHI-Fragments aus pKJS32 in pKT231

Zwei Reaktionsmischungen, die eine bestehend aus 10 µl (500 ng) pKJS32, 5 µl Wasser, 2 µl TAS-Puffer und je 1 µl (1 Unit) von verdünnten Lösungen der Enzyme EcoRI, BamHI und PstI, die andere bestehend aus 10 µl (250 ng) pKT231, 6 µl Wasser, 2 µl TAS-Puffer und je 1 µl (1 Unit) von verdünnten Lösungen der Enzyme EcoRI und BamHI, werden 120 min bei 37 °C inkubiert und zum Abstoppen der Reaktion für 15 min auf 68 °C erhitzt. Anschließend werden je 10 µl der beiden Restriktionsansätze gemischt, mit 50 µl Wasser, 8 µl 10-fach konzentriertem Ligationspuffer und 2 µl (2 Units) T4-DNA-Ligase versetzt und 16 Stunden bei 14 °C inkubiert. 0.2 ml kompetente Zellen von *E. coli* LE392, hergestellt nach dem literaturbekannten Verfahren von T.J. Silhavy et al. (Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbour Labo-

ratory, Cold Spring Harbour, New York, 1984), werden mit 10 µl des Ligationsansatzes gemischt, 40 min auf Eis belassen, 3 min auf 42 °C erhitzt, mit 2 ml LB-Medium gemischt und 60 min bei 37 °C inkubiert. Portionen von 50 µl bis 200 µl werden auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, die 50 µg/ml Kanamycin enthalten. Die Platten werden 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

c) Identifizierung rekombinanter Plasmide

Die so erhaltenen Kanamycin-resistenten Klone werden parallel auf zwei LB-Agar-Platten ausgestrichen, wovon eine 25 µg/ml Streptomycin, die andere 50 µg/ml Kanamycin enthält. Aus Klonen, die sich in diesem Test als Streptomycin-resistent erweisen, wird die Plasmid-DNA nach dem Schnellverfahren nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) isoliert. Restriktion der DNA mit XbaI und anschließende elektrophoretische Auftrennung der DNA-Bruchstücke in einem 0.7%igen Agarosegel erlaubt die Identifizierung von neu-kombinierten Plasmiden, die zwei XbaI-Fragmente mit den Größen 3.0 und 9.7 Kilobasen ergeben. Werden die gleichen Plasmide gleichzeitig mit EcoRI und BamHI geschnitten, so ergibt die elektrophoretische Analyse zwei Bruchstücke der Größen 1.5 und 11.2 Kilobasen. Bei den so identifizierten Plasmiden handelt es sich um Rekombinanten aus dem großen EcoRI/BamHI-Fragment von pKT231 und dem 1.5 Kilobasen großen EcoRI/BamHI-Fragment, das aus der Insert-DNA des Plasmids pKJS32 stammt. Sie werden als pKJEAB130 bezeichnet.

Beispiel 7: Herstellung des Plasmids pKJS(X)630

a) Isolierung des Plasmids pKJSB330

Der in Beispiel 4 erhaltene Klon von *E. coli* S17-1, der das neu-kombinierte Plasmid pKJSB330 enthält, wird in 400 ml LB-Medium mit einem Zusatz von 50 µg/ml Kanamycin 16 Stunden bei 37 °C angezogen und aus den abzentrifugierten Zellen wird die Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) isoliert.

b) Entfernen eines BamHI/XbaI-Fragments aus dem Plasmid pKJSB330

Eine Reaktionsmischung, bestehend aus 20 µl (1 µg) pKJSB330, 15 µl Wasser, 4 µl TAS-Puffer, 0.5 µl (2 Units) verdünnter XbaI-Lösung und 0.5 µl (2 Units) verdünnter BamHI-Lösung, wird 120 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden 20 µl gepuffertes Phanol nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) zugesetzt, gemischt, nach Zusatz von 20 µl Chloroform: Isoamylalkohol (24:1) wird nochmals gemischt und abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase

wird abgenommen und mit 120 μ l -20 °C kaltem Ethanol gemischt. Die Mischung wird 30 min bei -20 °C aufbewahrt und dann abzentrifugiert. Die gefällte DNA wird mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 20 μ l Klenow-Reaktionslösung (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 7 mM MgCl₂, 10 U/ml DNA-Polymerase I (=Klenowenzym)) aufgenommen. Nach 5 minütiger Vorinkubation bei 37 °C werden 2 μ l einer Lösung aller 4 Desoxynukleotidtriphosphate (0.125 mM ATP, 0.125 mM CTP, 0.125 mM GTP, 0.125 mM TTP, Pharmacia) hinzugefügt und weitere 5 min inkubiert. Danach wird der Ansatz mit 80 μ l Ligationspuffer, der 25 U/ml T4-DNA-Ligase enthält, gemischt und 6 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wird 16 Stunden bei 14 °C inkubiert. 0.2 mL einer Suspension kompetenter Zellen von *E. coli* S17-1, hergestellt nach dem Verfahren von T.J. Silhavy et al. (Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour, New York, 1984), werden mit 10 μ l des Ligationsansatzes gemischt, nach 40 min Inkubation auf Eis durch Hitzebehandlung (3 min, 42 °C) transformiert, mit 2 mL LB-Medium gemischt und 60 min bei 37 °C inkubiert. Von der Zellsuspension werden dann Portionen von 50 bis 200 μ l auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, die 50 μ g/ml Kanamycin enthalten. Die Platten werden 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

c) Identifizierung der verkleinerten Plasmide

Aus den so erhaltenen Kanamycin-resistenten Klonen wird die Plasmid-DNA mittels des bekannten Schnellverfahrens der alkalischen Lyse nach T. Maniatis et al. (vgl. oben), isoliert. Durch Restriktion der Plasmide mit SmaI und anschließender elektrophoretischer Trennung der DNA-Bruchstücke in einem 0.7 %igen Agarosegel werden Plasmide identifiziert, die den DNA-Abschnitt zwischen der BamHI-Schnittstelle und der XbaI-Schnittstelle auf dem Insert von pKJSB330 verloren haben. Diese Plasmide liefern in der Restriktionsanalyse zwei SmaI-Fragmente mit einer Länge von 2.6 und 9.9 Kilobasen und werden als pKJS(X)630 bezeichnet. Sie sind damit eindeutig von dem Ausgangsprodukt pKJSB330 zu unterscheiden.

Beispiel 8: Herstellung der Plasmide pTJSS'035 und pTJSS'036

a) Isolierung der Plasmide pT7-5, pT7-6 und pKJS32

Zwei Stämme von *E. coli* HMS174, von denen einer das Plasmid pT7-5, der andere das Plasmid pT7-6 enthält, werden in je 400 mL LB-Medium nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) mit einem Zusatz von 50 μ g/ml Ampicillin 16 Stunden bei 37 °C angezogen. Aus den abzentrifugierten Zellen wird die

Plasmid-DNA durch das bekannte Verfahren der alkalischen Lyse nach T. Maniatis isoliert. Die Isolierung von pKJS32 wird in Beispiel 5 beschrieben.

b) Klonierung des SacI/Sal I-Fragments aus pKJS32 in pT7-5 und pT7-6

Ein Reaktionsgemisch (A), bestehend aus 20 μ l (1 μ g) pKJS32, 15 μ l Wasser, 4 μ l TAS-Puffer und je 0.5 μ l (2 Units) der Enzyme SacI und Sal I, werden 120 min bei 37 °C inkubiert. Zwei weitere Reaktionsgemische, bestehend aus entweder 2 μ l (1 μ g) pT7-5 (B) oder 2 μ l (1 μ g) pT7-6 (C), 15 μ l Wasser, 2 μ l TAS-Puffer und je 0.5 μ l (2 Units) der Enzyme SacI und Sal I, werden unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Alle drei Reaktionen werden durch Erhitzen auf 68 °C für 15 min abgestoppt. Je 13 μ l des Restriktionsansatzes A (pKJS32) werden mit 7 μ l des Restriktionsansatzes B (pT7-5) bzw. 7 μ l des Restriktionsansatzes C (pT7-6) gemischt. Zu den beiden Mischungen werden je 50 μ l Wasser, 8 μ l 10-fach konzentrierter Ligationspuffer und 2 μ l (2 Units) T4-DNA-Ligase gegeben. Beide Ligationsansätze werden 16 Stunden bei 14 °C inkubiert. Je 0.2 ml kompetente Zellen von E. Coli LE392, hergestellt nach dem Verfahren T.J. Silhavy et al. (Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York, 1984), werden mit je 10 μ l der Ligationsansätze gemischt, 40 min auf Eis. belassen, 3 min auf 42 °C erhitzt, mit 2 ml LB-Medium gemischt und 60 min bei 37 °C inkubiert. Portionen von 50 μ l bis 200 μ l werden auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, die 50 μ g/ml Ampicillin enthalten. Die Platten werden 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

c) Identifizierung rekombinanter Plasmide

Aus den so erhaltenen Ampicillin-resistenten Klonen wird die Plasmid-DNA nach dem Bekannten Schnellverfahren der alkalischen Lyse nach T. Maniatis et al. (vgl. oben), isoliert. Durch Restriktion der Plasmide mit BglII und BamHI, sowie durch doppelte Restriktion mit BamHI und HindIII und anschließende elektrophoretische Auftrennung der Fragmente in einem 0.7%igen Agarosegel werden Plasmide identifiziert, die aus einem der beiden Vektorplasmide pT7-5 oder pT7-6 und dem kleinen SacI/SalI-Fragment von pKJS32 bestehen. Diese neu kombinierten Plasmide liefern dabei im Falle von pT7-5 als Ausgangsprodukt zwei BglII-Fragmente der Größen 3.0 Kilobasen und 2.2 Kilobasen, ein BamHI-Fragment der Größe 5.2 Kilobasen und zwei BamHI/HindIII-Fragmente der Größen 3.2 und 2.0 Kilobasen und werden als pTJSS'035 bezeichnet. Im Falle von pT7-6 als Ausgangsprodukt ergeben sich

zwei *Bgl*III-Fragmente der Größen 2.8 Kilobasen und 2.2 Kilobasen, ein *Bam*HI-Fragment der Größe 5.0 Kilobasen und zwei *Bam*HI/*Hind*III-Fragmente der Größen 3.0 Kilobasen und 2.0 Kilobasen; sie werden als *gtJSS'036* bezeichnet. Die rekombinanten Plasmide unterscheiden sich damit eindeutig von ihren Ausgangsprodukten *pKJS32* und *pt7-5* bzw. *pt7-6*.

Beispiel 9: Herstellung der Plasmide *gtJS'8435* und *gtJS'8436*

a) Isolierung der Plasmide *pt7-5*, *pt7-6* und *pKJSB330*

Die Isolierung von *pt7-5* und *pt7-6* wird bereits in Beispiel 8 beschrieben, die Isolierung von *pKJSB330* wird in Beispiel 7 beschrieben.

b) Klonierung des kleinen *Sal*I/*Bam*HI-Fragments aus *pKJSB330* in *pt7-5* und *pt7-6*

Eine Reaktionsmischung (A), bestehend aus 40 μ l (2 μ g) *pKJSB330*, 5 μ l TAS-Puffer und je 2.5 μ l (4 Units) von verdünnten Lösungen der Enzyme *Sal*II und *Bam*HI, wird 120 min bei 37 °C inkubiert. Zwei weitere Reaktionsmischungen, bestehend aus 2 μ l (1 μ g) *pt7-5* (B) bzw. 2 μ l (1 μ g) *pt7-6* (C), 20 μ l Wasser, 3 μ l TAS-Puffer und je 2.5 μ l (4 Units) von verdünnten Lösungen der Enzyme *Sal*I und *Bam*HI, werden unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die Reaktionen werden durch Erhitzen auf 68 °C für 15 min abgestoppt. Der gesamte Restriktionsansatz A (*pKJSB330*) wird in einem Agarosegel [0.7% Agarose in TBE-Puffer nach T. Maniatis et al. (vgl. oben), das 0.5 μ g/ml Ethidiumbromid enthält, nach T. Maniatis et al. (vgl. oben)] elektrophoretisch aufgetrennt. Von den beiden unter UV-Licht (300 nm) sichtbaren DNA-Banden wird die kleinere, 2.0 Kilobasen große Bande durch das Verfahren der DEAE-Membranelution auf folgende Weise aus dem Gel isoliert: Ein geeignet dimensioniertes Stück einer DEAE-Membran (Schleicher und Schuell S&S NA-45) wird in einem Einschnitt 1 bis 2 mm unterhalb der zu eluierenden Bande platziert. Die Elektrophorese wird fortgesetzt, bis die betreffende Bande ganz von der Membran absorbiert worden ist. Die Membran wird anschließend aus dem Gel herausgenommen und 10 min mit 10 ml NET-Puffer (150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0) gewaschen. Die gewaschene Membran wird in 150 μ l HNET-Puffer (1 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0) 30 min bei 68 °C inkubiert. Die Lösung wird abgenommen und die Membran weitere 10 min mit 50 μ l HNET-Puffer inkubiert. Die vereinigten Elutionslösungen (200 μ l) werden mit 200 μ l Wasser verdünnt, mit 800 μ l kaltem (-20 °C) Ethanol gemischt und 30 min bei -20 °C aufbewahrt. Die gefällte

DNA wird abzentrifugiert und der Niederschlag in 90 µl Wasser aufgenommen. Nach Zusatz von 10 µl 3 M Natriumacetatlösung nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) wird mit 200 µl kaltem Ethanol erneut gefällt (30 min, -20 °C), abzentrifugiert, der Niederschlag mit kaltem 70%igen Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 80 µl Ligationspuffer aufgenommen. Davon werden je 40 µl mit 3 µl (100 ng) des Restriktionsansatzes B (pT7-5) bzw. 3 µl (100 ng) des Restriktionsansatzes C (pT7-6) und 2 µl (1 Unit) T4-DNA-Ligase versetzt und 16 Stunden bei 14 °C inkubiert. 0.2 ml kompetente Zellen von E. coli LE392, hergestellt nach dem Verfahren von T.J. Silhavy et al. (Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour, New York, 1984), werden mit 15 µl des Ligationsansatzes gemischt, 40 min auf Eis belassen, 3 min auf 42 °C erhitzt, mit 2 ml LB-Medium gemischt und 60 min bei 37 °C inkubiert. Portionen von 50 µl bis 200 µl werden auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, die 50 µg/ml Ampicillin enthalten. Die Platten werden 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

c) Identifizierung rekombinanter Plasmide

Aus den so erhaltenen Ampicillin-resistenteren Klonen wird die DNA nach dem bekannten Schnellverfahren der alkalischen Lyse nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) isoliert. Durch Restriktion der Plasmide mit EcoRI und anschließender elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente in einem 0.7%igen Agarosegel werden Plasmide identifiziert, die das kleine SalI/BamHI-Fragment aus pKJSB330 in einem der beiden Vektorplasmide enthalten. Rekombinante Plasmide mit pT7-5 als Ausgangsprodukt ergeben zwei EcoRI-Fragmente der Größen 3.0 Kilobasen und 1.5 Kilobasen und werden als pTJS'B435 bezeichnet, solche mit pT7-6 als Ausgangsprodukt liefern zwei EcoRI-Fragmente der Größen 2.8 Kilobasen und 1.5 Kilobasen und werden mit pTJS'B436 benannt.

Beispiel 10: Herstellung der Plasmide pTJS'X535 und pTJS'X536

a) Isolierung der Plasmide pT7-5, pT7-6 und pTJSS'035

E. coli LE392, der das in Beispiel 8 hergestellte Plasmid pTJSS'035 enthält, wird in 400 ml LB-Medium mit einem Zusatz von 50 µg/ml Ampicillin 16 Stunden bei 37 °C angezogen. Aus den abzentrifugierten Zellen wird die Plasmid-DNA nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) isoliert. Die Isolierung von pT7-5 und pT7-6 wird in Beispiel 8 beschrieben.

b) Klonierung des kleinen SalI/XbaI-Fragments aus pTJSS'035 in pT7-5 und pT7-6

Ein Reaktionsgemisch (A), bestehend aus 6 μ l (3 μ g) pTJSS'035, 15 μ l Wasser, 3 μ l TAS-Puffer und je 2 μ l (5 Units) von verdünnten Lösungen der Enzyme XbaI, SalI und BamHI, wird 120 min bei 37 °C inkubiert. Zwei weitere Reaktionsgemische, bestehend aus entweder 2 μ l (1 μ g) pT7-5 (B) oder 2 μ l (1 μ g) pT7-6 (C), 23 μ l Wasser, 3 μ l TAS-Puffer und je 1 μ l (2.5 Units) von verdünnten Lösungen der Enzyme XbaI und SalI, werden in gleicher Weise inkubiert. Die Reaktionen werden durch Erhitzen auf 68 °C für 15 min gestoppt. In zwei verschiedenen Ligationsansätzen werden je 5 μ l (500 ng) des Restriktionsansatzes A (pTJSS'035) mit entweder 15 μ l des Restriktionsansatzes B (pT7-5) oder 15 μ l des Restriktionsansatzes C (pT7-6), 50 μ l Wasser, 8 μ l Ligationspuffer und 2 μ l (2 Units) T4-DNA-Ligase gemischt und 16 Stunden bei 14 °C inkubiert. 0.2 ml kompetente Zellen von *E. coli* LE392, hergestellt nach dem Verfahren von T.J. Silhavy et al. (Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour, New York, 1984), werden mit 15 μ l des Ligationsansatzes gemischt, 40 min auf Eis belassen, 3 min auf 42 °C erhitzt, mit 2 ml LB-Medium gemischt und 60 min bei 37 °C inkubiert. Portionen von 50 μ l bis 200 μ l werden auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, die 50 μ g/ml Ampicillin enthalten. Die Platten werden 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

c) Identifizierung rekombinanter Plasmide

Aus den so erhaltenen Ampicillin-resistenten Klonen wird die Plasmid-DNA nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) isoliert. Durch Restriktion mit den Enzymen SmaI und EcoRI, sowie durch doppelte Restriktion mit EcoRI und SalI werden Plasmide identifiziert, die das kleine, 1.4 Kilobasen große SalI/XbaI-Fragment aus pTJSS'035 in einem der beiden Vektorplasmide pT7-5 bzw. pT7-6 enthalten. Rekombinante Plasmide mit pT7-5 als Ausgangsprodukt ergeben zwei EcoRI-Fragmente der Größen 3.0 und 0.8 Kilobasen, zwei SmaI-Fragmente der Größen 2.4 und 1.4 Kilobasen und drei EcoRI/SalI-Fragmente der Größen 2.4, 0.8 und 0.6 Kilobasen; sie werden als pTJS'X535 bezeichnet. Rekombinante Plasmide mit pT7-6 als Ausgangsprodukt liefern zwei EcoRI-Fragmente der Größen 2.8 und 0.8 Kilobasen, zwei SmaI-Fragmente der Größen 2.2 und 1.4 Kilobasen und drei EcoRI/SalI-Fragmente der Größen 2.2, 0.8 und 0.6 Kilobasen; sie werden mit pTJS'X536 benannt. Die rekombinanten Plasmide unterscheiden sich damit eindeutig von ihren Ausgangsprodukten.

Beispiel 11: Herstellung des Plasmids pTJS'X535omega

a) Isolierung der Plasmide pTJS'X535 und pDOC37

Zwei *E. coli* Stämme LE392, wovon einer das in Beispiel 10 hergestellte Plasmid pTJS'X535, der andere das Plasmid pDOC37 enthält, werden in je 400 ml LB-Medium mit einem Zusatz von 50 µg/ml Ampicillin 16 Stunden bei 37 °C angezogen. Aus den abzentrifugierten Zellen wird die Plasmid-DNA nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) isoliert. Das Plasmid pDOC37 enthält das Omega-Fragment zwischen zwei EcoRI-Restriktionsstellen. Anstelle von pDOC37 kann in gleicher Weise das von Prentki und Krisch, 1984, in Gene 29:103, beschriebene Plasmid pHIP45omega als Quelle für das Omega-Fragment dienen.

b) Klonierung des Omega-Fragments aus pDOC37 in die BglII-Stelle von pTJS'X535

Zwei Reaktionsmischungen, davon eine bestehend aus 2 µl (1 µg) pTJS'X535, 14 µl Wasser, 2 µl TAS-Puffer und 2 µl (3 Units) BglII, die andere bestehend aus 2 µl (2 µg) pDOC37, 14 µl Wasser, 2 µl TAS-Puffer und 2 µl (4 Units) einer verdünnten BamHI-Lösung, werden 120 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionen werden durch Erhitzen auf 68 °C für 15 min gestoppt. Je 10 µl aus beiden Restriktionsansätzen werden vereinigt und mit 80 µl Ligationspuffer und 1 µl (1 Unit) T4-DNA-Ligase versetzt. Der Ligationsansatz wird 16 Stunden bei 14 °C inkubiert. 0.2 ml kompetente Zellen von *E. coli* LE 392, hergestellt nach T.J. Silhavy et al. (Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour, New York, 1984), werden mit 10 µl des Ligationsansatzes gemischt, 40 min auf Eis belassen, 3 min auf 42 °C erhitzt, mit 2 ml LB-Medium gemischt und 60 min bei 37 °C inkubiert. Portionen von 50 µl bis 200 µl werden auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, die 50 µg/ml Ampicillin und 80 µg/ml Spectinomycin enthalten. Die Platten werden 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Durch Selektion mittels Spectinomycin wird sichergestellt, daß alle wachsenden Klone ein Plasmid mit dem Omega-Fragment enthalten, da dieses das Gen für die Expression der Spectinomycinresistenz enthält.

c) Identifizierung rekombinanter Plasmide

Aus den so erhaltenen Ampicillin- und Spectinomycin-resistenen Klonen wird die Plasmid-DNA nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) isoliert. Durch Restriktion mit HindIII werden die neukombinierten Plasmide identifiziert. Ergeben sich dabei drei HindIII-Fragmente der Größen 0.6, 2.0 und 3.2 Kilobasen, so handelt es sich dabei um Derivate von pTJS'X535, die das

Omegafragment an der ehemaligen BglII-Schnittstelle eingebaut haben. Durch Ligation der kompatiblen überlappenden Enden der BglII- und BamHI-Fragmente gehen dabei die Restriktionsstellen BglII und BamHI an der Verknüpfungsstelle verloren. Diese neu kombinierten Plasmide werden als pTJS'X535omega bezeichnet.

Beispiel 12: Herstellung der Phagen MJSS'030 und MJSS'031

a) Isolierung des Plasmids pKJS32 und der doppelsträngigen Formen der Phagen M13tg130 und M13tg131

Der Stamm *E. coli* JM101 [J. Messing et al. Nucl. Acids Res. 9:309 (1981)] sowie Doppelstrang-DNA der Vektoren M13tg130 und M13tg131 [M.P. Kieny et al. Gene 26:91 (1983)] können von Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig, bezogen werden. Doppelstrang-DNA kann auch nach folgendem Verfahren gewonnen werden: 0.2 ml kompetente Zellen von *E. coli* JM101, hergestellt nach T.J. Silhavy et al. (Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour, New York, 1984), werden mit Einzelstrang- oder Doppelstrang-DNA der M13-Vektoren nach einem literaturbekannten Verfahren.

transformiert, mit 3 ml geschmolzenem (45 °C) H-Top-Agar (10 g/l Trypton, 8 g/l NaCl, 8 g/l Agar) gemischt und auf H-Agar-Platten (10 g/l Trypton, 8 g/l NaCl, 12 g/l Agar) ausgegossen. Die erkaltenen Platten werden 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. 2 ml TY-Medium (16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) werden mit 20 µl einer über-Nacht-Kultur (16 Stunden, 37 °C) von *E. coli* JM101 in TY-Medium und einem einzelnen Plaque von der H-Agar-Platte angeimpft. Nach 16 Stunden Wachstum bei 37 °C werden die phagen-infizierten Zellen zusammen mit 2 ml einer frischen über-Nacht-Kultur von *E. coli* JM101 in 400 ml TY-Medium überimpft und 16 Stunden bei 37 °C angezogen. Aus den abzentrifugierten Zellen wird die Doppelstrang-DNA nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) isoliert. Die Isolierung von Plasmid pKJS32 wird bereits in Beispiel 5 beschrieben.

b) Klonierung des SacI/SalI-Fragments aus pKJS32 in M13tg130 und M13tg131
Eine Reaktionsmischung (A), bestehend aus 30 µl (1.5 µg) pKJS32, 20 µl Wasser, 6 µl TAS-Puffer und je 2 µl (4 Units) von verdünnten Lösungen der Enzyme SacI und SalI, wird 120 min bei 37 °C inkubiert. Zwei weitere Reaktionsmischungen, bestehend aus 10 µl (300 ng) Doppelstrang-DNA von M13tg130 (B) oder M13tg131 (C), 25 µl Wasser, 4 µl TAS-Puffer und je 0.5 µl (1 Unit) von verdünnten Lösungen der Enzyme SacI und SalI, werden in

gleicher Weise inkubiert und zum Abstoppen der Reaktionen für 15 min auf 68 °C erhitzt. Der gesamte Restriktionsansatz A wird in einem Agarosegel (0,7% Agarose, 0.5 µg/ml Ethidiumbromid in TBE-Puffer nach T. Maniatis et al. (vgl. oben)) elektrophoretisch aufgetrennt. Von den beiden im UV-Licht sichtbaren DNA-Banden wird die kleinere, 2.8 Kilobasen große SacI/SalI-Bande in gleicher Weise mittels einer DEAE-Membran aus dem Gel isoliert, wie dies für die 2.0 Kilobasen große Bande in Beispiel 9 beschrieben wird. Die DNA wird zuletzt in 80 µl Wasser aufgenommen, davon werden je 40 µl mit 20 µl der Restriktionsansätze A (M13tg130) bzw. B (M13tg131) und 40 µl Wasser versetzt, mit 100 µl gepuffertem Phenol/Chloroform nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) gemischt und zentrifugiert. Die oberen wässrigen Phasen werden abgenommen und nach Zusatz von 10 µl 3 M Natiumacetatlösung nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) mit je 200 µl kaltem (-20 °C) Ethanol gemischt. Die Mischungen werden 30 min bei -20 °C belassen, anschließend zentrifugiert, die Niederschläge mit kaltem 70%igen Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 40 µl Ligationspuffer aufgenommen. Die beiden Ansätze werden mit je 1 µl (1 Unit) T4-DNA-Ligase versetzt und 16 Stunden bei 14 °C inkubiert. Je 0.2 ml kompetente Zellen von *E. coli* JM101, hergestellt nach T.J. Silhavy et al. (Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour, New York, 1984), werden mit 10 µl der Ligationsansätze gemischt, 40 min auf Eis belassen, 3 min auf 42 °C erhitzt und mit je 3 ml geschmolzenem (45 °C) H-Top-Agar gemischt. Die Mischungen werden mit je 40 µl IPTG (100 mM) und 40 µl X-Gal (2% in Dimethylformamid) versetzt und auf H-Agar-Platten ausgegossen. Die erkalteten Platten werden 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

c) Identifizierung der rekombinanten Phagen

Von den so erhaltenen Plaques stammen diejenigen von rekombinanten Phagen, welche keine blaue Färbung aufweisen. Zur weiteren Identifizierung wird die Doppelstrang- und die Einzelstrang-DNA aus den farblosen Plaques nach literaturbekannten Verfahren, zusammengefaßt im "M13 Cloning and Sequencing Handbook" von Amersham, isoliert. Durch Restriktion der Doppelstrang-DNA mit BglII und anschließende elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente werden Derivate von M13tg130 bzw. M13tg131 identifiziert, die das kleine SacI/SalI-Fragment aus PKJS32 enthalten. Rekombinante Phagen mit M13tg130 als Vektor ergeben drei BglII-Fragmente der Größen 0.7, 2.2 und 7.1 Kilobasen und werden als MJSS'030 bezeichnet, solche mit M13tg131 ergeben vier BglII-Fragmente der Größen 0.6, 0.7, 2.2 und 6.6 Kilobasen und

werden als MJSS'031 bezeichnet. Sie unterscheiden sich damit eindeutig von ihren Ausgangsprodukten.

Beispiel 13: Herstellung der tfdA-Mutanten *Alcaligenes eutrophus* JMP134:

Tn5-2 und JMP134:Tn5-4

a) Transposonmutagenese von *Alcaligenes eutrophus* JMP134

10 ml PYE-Medium (3 g/l Pepton, 3 g/l Hefeextrakt) werden mit 0.5 ml einer über-Nacht-Kultur (16 Stunden, 30 °C) von *Alcaligenes eutrophus* JMP134 [R.H. Don et al. J. Bacteriol. 145:681 (1981)] angeimpft und 8 Stunden bei 30 °C geschüttelt. 10 ml LB-Medium nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) werden mit 0.1 ml einer über-Nacht-Kultur von *E. coli* S17-1 [Biotechnology 1:784 (1983)], die das Plasmid pSUP2021 enthält, angeimpft und 5 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Von beiden Kulturen wird anschließend im Photometer die optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge bestimmt. Die Kulturen werden im Verhältnis 1:1 bezüglich ihrer optischen Dichte gemischt und 1.5 ml der Mischung werden auf einer PYE-Agar-Platte [R.H. Don et al. J. Bacteriol. 145:681 (1981)] verteilt. Die Platte wird 16 Stunden bei 30 °C inkubiert. Anschließend werden die Bakterien mit 1.5 ml steriler 0.7%iger NaCl-Lösung von der Platte gespült und die Bakteriensuspension wird in zwei Schritten mit 0.7%iger NaCl-Lösung jeweils 1:10 (0.1 ml + 0.9 ml) verdünnt. Von jeder Verdünnung werden Portionen von 50 µl, 100 µl, 200 µl und 400 µl auf Minimal-Agar-Platten (1.6 g/l Dikaliumhydrogenphosphat, 0.4 g/l Kaliumdihydrogensulfat, 1 g/l Ammoniumsulfat, 0.05 g/l Magnesiumsulfatx7Wasser, 0.01 g/l Eisen(II)sulfatx7Wasser, 15 g/l Agar) ausgestrichen, die zusätzlich 2 g/l Fructose und 380 µg/ml Kanamycin enthalten. Die Platten werden 3 bis 7 Tage bei 30 °C inkubiert.

b) Test der transposonhaltigen Stämme auf 2,4-D-Abbau

Die so erhaltenen Kanamycin-resistenten Klone stellen Abkömmlinge des Stammes JMP134 dar, die das Transposon Tn5 stabil in ihrem Genom integriert haben. Sie werden parallel auf zwei Minimal-Agar-Platten ausgestrichen, von denen eine 1 mM 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, Natriumsalz (2,4-D), die andere 2 g/l Fructose und 380 µg/ml Kanamycin enthält. Die Platten werden 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Stämme, die eine Mutation in einem der für den 2,4-D-Abbau verantwortlichen Gene aufweisen, können 2,4-D nicht als Wachstumssubstrat verwenden (2,4-D-negativ). Sie treten mit einer Häufigkeit von 0,1 bis 1 % auf, bezogen auf die Gesamtheit der transposonhaltigen,

Kanamycin-resistenten Klone.

c) Identifizierung des Gendefekts der 2,4-D-negativen Mutanten

Die so erhaltenen 2,4-D-negativen Mutanten werden parallel auf zwei Minimal-Agar-Platten ausgestrichen, von denen eine 2 mM 3-Chlorbenzoësäure, Natriumsalz (3-CB), die andere 2 g/l Fructose und 380 µg/ml Kanamycin enthält. Die Platten werden 3 Tage bei 30 °C inkubiert. 2,4-D-negative Transposonmutanten vom Stamm JMP134, die eine Mutation in den Genen *tfdB* und *tfdE* des 2,4-D-Abbaus aufweisen, können 3-CB nicht als Wachstumssubstrat verwenden (3-CB-negativ), wie Don et al. [J. Bacteriol. 161:85 (1985)] zeigen konnten. Mutanten in den Genen *tfdA* und *tfdB* hingegen können auf 3-CB als einziger Kohlenstoffquelle wachsen (3-CB-positiv). Transposonmutanten, die sich in diesem Test als 3-CB-positiv erweisen, werden demnach weiterhin mittels eines Enzymtests auf Defekte in den Genen *tfdA* oder *tfdB* untersucht. Dazu werden die Stämme in 250 ml Minimal-Medium (wie oben, ohne Agar) mit einem Zusatz von 15 mM Natriumpyruvat und 1 mM 3-CB 16 Stunden bei 30 °C angezogen. Die Zellen werden durch Zentrifugation bei 4 °C geerntet, dreimal in 10 ml kaltem (4 °C) Minimal-Medium (ohne Kohlenstoffquelle) gewaschen und rezentrifugiert, und zuletzt in soviel Minimal-Medium suspendiert, daß sich eine optische Dichte bei 420 nm von 30 ergibt. Für den Enzymtest der 2,4-D-monooxygenase bzw. der 2,4-Dichlorphenolhydroxylase wird 1 Volumenanteil der Zellsuspension mit 9 Volumenteilen eines sauerstoffgesättigten Minimal-Mediums gemischt, so daß sich eine optische Dichte bei 420 nm von 3 ergibt. Mit Hilfe einer handelsüblichen Sauerstoffelektrode wird dann über 10 min die Sauerstoffaufnahme ohne Substratzusatz verfolgt. Anschließend wird 2,4-D zu einer Endkonzentration von 1 mM oder 2,4-Dichlorphenol zu einer Endkonzentration von 0,2 mM zugegeben und die Abnahme der Sauerstoffkonzentration über 20 min verfolgt. Durch diesen Test lassen sich *tfdB*-Mutanten von allen anderen Mutationstypen sowie vom Wildtypstamm JmP134 unterscheiden: Sie zeigen nach Zusatz von 2,4-D keinerlei Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs, während nach Zusatz von 2,4-Dichlorphenol eine signifikante Steigerung der Sauerstoffaufnahme eintritt. Der Wildtypstamm sowie *tfdB*-Mutanten zeigen nach Zusatz von 2,4-D als Substrat einen gesteigerten Sauerstoffverbrauch und damit eine intakte 2,4-D-monooxygenase. Bei den beiden Transposonmutanten JMP134:Tn5-2 und JMP134:Tn5-4 handelt es sich um zwei 2,4-D-negative, 3-CB-positive Mutanten mit einer nachweisbaren 2,4-Dichlorphenolhydroxylase aber ohne nachweisbare 2,4-D-monooxygenase.

ERSATZBLATT

Sie können damit als *tfda*-Mutanten identifiziert werden. Diese Zuordnung wird durch weitere in den folgenden Beispielen beschriebene Versuche bestätigt.

Beispiel 14: Expression klonierter *tfda*-Gene in anderen gram-negativen

Bakterien als *E. coli*

a) Herstellung von Donorstämmen für den konjugativen Transfer *tfda*-haltiger Plasmide

Die auf der Grundlage von mobilisierbaren Vektoren mit breitem Wirtsbereich wie pVK101 [V.C. Knauf et al. Plasmid 8:45 (1982)], pGSS33 [G.S. Sharpe, Gene 29:93 (1984)] und pKT231 [M. Bagdasarian et al. Current Topics in Microbiology and Immunology 96:47 (1982)] konstruierten Plasmide, deren Herstellung in den Beispielen 1 bis 7 beschrieben ist, können aus dem mobilisierenden Stamm *E. coli* S17-1 [Biotechnology 1:784 (1983)] durch Konjugation auf andere gram-negative Bakterien wie z.B. *Alcaligenes eutrophus* und *Pseudomonas putida* übertragen werden. Dazu müssen sie erst durch Transformation in *E. coli* S17-1 gebracht werden, sofern sie nicht bereits in diesem Stamm kloniert wurden. Zu diesem Zweck wird aus den Klonen von *E. coli* LE392, die das betreffende Plasmid enthalten, die Plasmid-DNA nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) isoliert. 0.2 ml kompetente Zellen von *E. coli* LE392, hergestellt nach T.J. Silhavy et al. (Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour, New York, 1984), werden mit 1 µl der isolierten Plasmid-DNA gemischt, 40 min auf Eis belassen, 3 min auf 42 °C erhitzt, mit 2 ml LB-Medium gemischt und 60 min bei 37 °C inkubiert. Portionen von 50 µl bis 200 µl werden auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, die das entsprechende zur Selektion geeignete Antibiotikum enthalten. Die Platten werden 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

b) Konjugativer Transfer

Ein so erhaltener Stamm von *E. coli* S17-1, der eines der in den Beispielen 1 bis 7 beschriebenen Plasmide enthält, wird 16 Stunden bei 37 °C in 5 ml LB-Medium angezogen, das ein zur Selektion geeignetes Antibiotikum enthält. Als Rezipient wird einer der beiden in Beispiel 13 isolierten *tfda*-Mutanten (Fall A), der pJP4-freie Stamm *Alcaligenes eutrophus* JMP222 [R.H. Don et al. J. Bacteriol. 145:681 (1981)] (Fall B) oder *Pseudomonas spec.* B13

[E. Dorn et al. Arch. Microbiol. 99:61 (1974)] (Fall C) in 5 ml PYE-Medium (3 g/l Pepton, 3 g/l Hefeextrakt) 16 Stunden bei 30 °C angezogen. Die Zellen des Donorstammes werden abzentrifugiert und in dem doppelten Volumen PYE-Medium suspendiert. Die Suspension der Donorzellen und die Kultur des Rezipienten werden zu gleichen Teilen gemischt. 100 µl der Mischung werden auf einen Membranfilter (Millipore HA 0.45 µm) pipettiert, der sich auf der Oberfläche einer PYE-Agar-Platte befindet. Anschließend wird die Platte 6 Stunden bei 30 °C inkubiert. Dann werden die Zellen mit 1 ml 0.7%iger NaCl-Lösung vom Filter abgewaschen und die Zellsuspension wird in 7 Schritten jeweils 1:10 (0.1 ml + 0.9 ml) mit 0.7%iger NaCl-Lösung verdünnt. Von jeder Verdünnung werden 100 µl auf einer Minimal-Agar-Platte ausgestrichen, die eines der folgenden Wachstumssubstrate enthält: 1 mM 2,4-D im Fall A (tfda-Mutante), 4 mM Phenoxyessigsäure-Na im Fall B (Alcaligenes eutrophus JMP222) oder 1 mM 4-Chlorphenoxyessigsäure-Na im Fall C (Pseudomonas B13). Die Platten werden im Fall A 14 Tage, im Fall B und C 4 Tage bei 30 °C inkubiert.

c) Eigenschaften der neu entstandenen Stämme

Mobilisierbare Plasmide mit breitem Wirtsbereich aus der oben genannten Gruppe, welche ein intaktes tfda-Gen enthalten, ermöglichen nach konjugativem Transfer dem jeweiligen Rezipienten-Stamm, eine funktionsfähige 2,4-D-monooxygenase zu synthetisieren. Dies führt im Fall A (tfda-Mutante) zur Komplementation der Mutation und damit zur Wiederherstellung der Wildtypeigenschaft in Bezug auf die Verwertung von 2,4-D, d.h. es entstehen 2,4-D-positive Stämme, die auf 2,4-D-Minimal-Agar-Platten wachsen. Die von tfda kodierte 2,4-D-monooxygenase ist außerdem in der Lage, neben 2,4-D auch die mit 2,4-D chemisch verwandten Verbindungen Phenoxyessigsäure und 4-Chlorphenoxyessigsäure enzymatisch umzusetzen, wobei als Produkte Phenol bzw. 4-Chlorphenol gebildet werden. Da nun der Stamm Alcaligenes eutrophus JMP222 Gene für die vollständige Metabolisierung von Phenol besitzt, ergeben sich nach konjugativem Transfer tfda-haltiger Plasmide im Fall B Stämme mit der neuen Eigenschaft, Phenoxyessigsäure als Wachstumssubstrat zu nutzen. In gleicher Weise ermöglicht es ein tfda-haltiges Plasmid einen damit ausgestatteten Pseudomonas B13, welcher komplettete Abbauwege für Phenol und 4-Chlorphenol besitzt, auf den Substraten Phenoxyessigsäure und 4-Chlorphenoxyessigsäure zu wachsen (Fall C). Der Test auf Verwertung eines bestimmten Substrates, wie er oben beschrieben wird, eignet sich besonders zum Nachweis der Expression des tfda-Gens durch in

mobilisierbaren Broad-Host-Range-Vektoren klonierte DNA-Fragmente und deren verkürzte Derivate, deren Herstellung in den Beispielen 1 bis 7 beschrieben wird. Dabei zeigt sich, daß die Plasmide pVJH21, pGJS3, pKJS31, pKJS32, pKJSE330, pKJS32RHAS' und PKJS(X)630 alle ein intaktes tfdA-Gen enthalten, während das Plasmid pKJE1B130 kein funktionsfähiges Genprodukt kodiert.

Beispiel 15: Anreicherung von tfdA-kodierter 2,4-D-monooxygenase in E. coli

a) Herstellung hochproduzierender E. coli Stämme

Die auf der Grundlage der von Tabor konstruierten Vektoren pT7-5 und pT7-6 hergestellten rekombinanten Plasmide, die in den Beispielen 8, 9, 10 und 11 beschrieben werden, enthalten klonierte DNA-Fragmente im Anschluß an einen starken Promotor des Phagen T7. Plasmide aus dieser Gruppe, welche ein intaktes tfdA-Gen in der richtigen Orientierung zum Promotor enthalten, können unter dem Einfluß der von dem Plasmid pGP1-2 [S. Tabor et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1074 (1985)] edprimierten T7-RNA-Polymerase in E. coli K38 in großen Mengen 2,4-D-monooxygenase produzieren. Da der Promotor spezifisch nur von der T7-RNA-Polymerase erkannt wird, und da diese auf dem Plasmid pGP1-2 unter der Kontrolle eines hitzesensitiven lambda-Repressors steht, kann die Synthese des Genproduktes durch Hitze induziert werden. Durch Zugabe von Rifampicin können außerdem die bakteriellen RNA-Polymerasen gehemmt werden. Zur Herstellung der hochproduzierenden Stämme wird die Plasmid-DNA aus den in den Beispielen 8 bis 11 erhaltenen plasmidhaltigen Stämmen von E. coli LE392 nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) isoliert. E. coli K38, der das Plasmid pGP1-2 enthält, wird 16 Stunden bei 30 °C in LB-Medium angezogen, das zur Selektion auf pGP1-2 mit 50 µg/ml Kanamycin versetzt worden ist. Aus der gewachsenen Kultur werden kompetente Zellen nach dem Verfahren von T.J. Silhavy et al. (Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour, New York, 1984), hergestellt. 0.2 ml kompetente Zellen werden mit 1 µl der isolierten DNA gemischt, 40 min auf Eis belassen, 5 min auf 37 °C erhitzt, mit 2 ml LB-Medium gemischt und 60 min bei 30 °C inkubiert. Portionen von 50 µl bis 200 µl werden auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, die 50 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin enthalten. Die Platten werden 16 Stunden bei 30 °C inkubiert.

b) Induzierte Produktion und radioaktive Markierung des tfdA-Genprodukts
Die so erhaltenen Ampicillin- und Kanamycin-resistenten Klone enthalten das Plasmid pGP1-2 und eines der rekombinanten pT7-Derivate. Sie werden

in 10 ml LB-Medium mit einem Zusatz von 50 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin bei 30 °C angezogen. Bei einer optischen Dichte von 0.5, gemessen bei 590 nm, werden 0.2 ml Kultur abzentrifugiert. Die Zellen werden in 5 ml M9-Medium nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) gewaschen, wieder abzentrifugiert und schließlich in 1 ml M9-Medium suspendiert, das 20 µg/ml Thiamin und je 0.01 % aller proteinogenen Aminosäuren außer Methionin und Cystein (insgesamt 18) enthält. Die Zellsuspension wird 60 min bei 30 °C geschüttelt, dann wird die Temperatur auf 42 °C erhöht. Nach 15 min werden 10 µl Rifampicin-Lösung (20 mg/ml in Methanol) zugegeben und der Ansatz wird weitere 10 min bei 42 °C belassen. Danach wird die Temperatur wieder auf 30 °C erniedrigt, nach 20 min wird der Ansatz mit 10 µCi L-(³⁵S) Methionin (Amersham, cell labeling grade) versetzt und 5 min bei Raumtemperatur belassen. Die Zellen werden anschließend abzentrifugiert, in 120 µl Auftragspuffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1 % Natriumlaurylsulfat, 1 % 2-Mercaptoethanol, 10 % Glycerin, 0.01 % Bromphenolblau) suspendiert und 3 min auf 95 °C erhitzt.

c) Identifizierung des spezifisch radioaktiv markierten tfdA-Genproduktes
Die so erhaltenen Proben werden auf ein 12.5%iges Polyacrylamid-Gel
[U.K. Laemmli, Nature 227:680 (1970)] geladen und die gesamten bakteriellen Proteine werden nach dem dort beschriebenen literaturbekannten Verfahren elektrophoretisch aufgetrennt. Nach beendeter Elektrophorese wird das Gel 30 min in einer Mischung aus 2.5 g SERVA Blau G, 454 ml Methanol, 92 ml Essigsäure und 454 ml Wasser gefärbt und anschließend 24 Stunden in einer Mischung aus 50 ml Methanol, 75 ml Essigsäure und 875 ml Wasser entfärbt. Das Gel wird auf einem Filterpapier (Whatman 3MM) mit Hilfe eines handelsüblichen Geltrockners getrocknet, anschließend wird nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) die Autoradiographie mit einem Röntgenfilm (Kodak Industrex AX) durchgeführt und der Film entwickelt. Auf den Autoradiogrammen wird ein einzelnes markiertes Protein bei denjenigen Stämmen identifiziert, welche neben pGP1-2 eines der Plasmide pTJSS'035, pTJS'B435, PTJS'X535 oder PTJS'X535_{omega} enthalten. Allen diesen homologen Plasmiden ist gemeinsam, daß das klonierte Fragment von der T7-RNA-Polymerase zum Sal I-Ende hin transkribiert wird. Bei Plasmiden mit der umgekehrten Orientierung des Inserts (pTJSS'036, pTJS'B435 und pTJS'X535) wird kein spezifisch markiertes Protein gefunden. Durch Vergleich mit Standardproteinen bekannter Größe wird das Molekulargewicht der markierten Proteine bestimmt. Dabei ergibt sich für die von pTJSS'035, pTJS'B435 und pTJS'X535 exprimierten Genprodukte ein

Molekulargewicht von 32 000, für das von pTJS'X535omega exprimierte Genprodukt ein Molekulargewicht von 29 000.

d) Induzierte Produktion mit Nachweis der enzymatischen Aktivität

Die oben erhaltenen Stämme von *E. coli* K38, welche pGP1-2 und eines der Plasmide pTJS'035, pTJS'8435, pTJS'X535 oder pTJS'X535omega enthalten, werden bei 30 °C in 20 ml LB-Medium mit einem Zusatz von 50 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin angezogen. Bei einer optischen Dichte von 1.0 bei 590 nm wird die Temperatur auf 42 °C erhöht und die Kultur 25 min geschüttelt. Danach werden 100 µl Rifampicin-Lösung (20 mg/ml in Methanol) zugegeben und die Kultur 2 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Der Nachweis der enzymatischen Aktivität der 2,4-D-monooxygenase in *E. coli* folgt dem von Amy et al.

[Appl. Env. Microbiol. 49:1237 (1985)] beschriebenen Verfahren des radioaktiven Enzymtests mit folgenden Änderungen: Die Zellen einer induzierten 20 ml-Kultur werden durch Zentrifugieren geerntet, mit 10 ml EM-Medium gewaschen, wieder abzentrifugiert und schließlich in 10 ml EM-Medium suspendiert. Die Zellsuspension wird in einem 250 ml Warburg-Kolben mit 10 ml Transformationspuffer gemischt, mit 200 µg unmarkiertem 2,4-D und 0.1 µCi 2,4-Dichlorphenoxy(2-¹⁴C)essigsäure (Amersham, 55 mCi/mmol) versetzt und im verschlossenen Kolben 4 Stunden bei 21 °C geschüttelt. Anschließend werden 0.5 ml beta-Phenylethylamin in das zentrale Gefäß des Warburg-Kolbens pipettiert und 2 ml 1 M Schwefelsäure werden in die Zellsuspension injiziert. Nach 1 Stunde Schütteln bei 21 °C wird das beta-Phenylethylamin in 5 ml Zählflüssigkeit (rotiszint 22, Roth) aufgenommen und die Radioaktivität der Probe im Szintillationszähler gemessen. Stämme von *E. coli* K38, welche neben pGP1-2 eines der Plasmide pTJS'035, pTJS'8435 oder pTJS'X535 enthalten, weisen in diesem Test hohe Enzymaktivität auf, während solche mit dem Plasmid pTJS'X535omega keine Enzymaktivität exprimieren.

Beispiel 16: Bestimmung der Basensequenz der in M13 klonierten DNA

a) Herstellung deletierter Phagen aus MJSS'030 und MJSS'031

Zur Sequenzierung des 2 Kilobasen großen BamHI/SalI-Fragments der rekombinanten Phagen nach der Methode von Sanger [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463 (1977)] wird zunächst durch gerichtete Deletion nach einem literaturbekannten Verfahren [G. Henikoff, Gene 28:351 (1984)] eine Serie von unterschiedlich verkürzten Phagen hergestellt, die es erlauben, durch überlappende Sequenzierung von jeweils 200 bis 300 Basen die gesamte Basen-

sequenz zu ermitteln. Dazu wird aus Stämmen von *E. coli* JM101, welche die in Beispiel 12 hergestellten Phagen MJSS'030 bzw. MJSS'031 enthalten, nach dem dort für die Phagenvektoren M13tg130 und M13tg131 beschriebenen Verfahren die Doppelstrang-DNA isoliert. 10 µg Doppelstrang-DNA des Phagen MJSS'030 werden mit den Enzymen PstI und SalI geschnitten, 10 µg Doppelstrang-DNA des Phagen MJSS'031 werden mit den Enzymen BamHI und SacI geschnitten. Die Restriktionsansätze werden mit Phenol extrahiert und die geschnittene DNA wird mit Ethanol gefällt. Die anschließende Verdauung der DNA mit Exonuclease III und S1-Nuclease, die Klenow-Füllung der überstehenden DNA-Enden und die Ligation erfolgen genau nach dem von Henikoff beschriebenen Verfahren mit folgender Änderung: Anstelle von S1-Nuclease wird Mung Bean Nuclease (Pharmacia) verwendet. Portionen von 0.2 ml kompetenter Zellen von *E. coli* JM101 [J. Messing et al. Nucl. Acids Res. 9:309 (1981)], hergestellt nach dem Verfahren von T.J. Silhavy et al. (Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour, New York, 1984), werden mit je 20 µl der Ligationsansätze versetzt, 40 min auf Eis belassen, 3 min auf 42 °C erhitzt, mit je 3 ml geschmolzenem (45 °C) H-Top-Agar (Beispiel 12) gemischt und auf H-Agar-Platten (Beispiel 12) ausgegossen. Die Platten werden 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

b) Identifizierung deletierter Phagen

E. coli JM101 wird in 2 ml TY-Medium (Beispiel 12) 16 Stunden bei 37 °C angezogen. 1 ml dieser Kultur wird mit 100 ml TY-Medium verdünnt und je 2 ml der verdünnten Zellsuspension werden mit einem der oben erhaltenen Plaques infiziert. Die Kulturen werden 5 Stunden bei 37 °C geschüttelt und dann zentrifugiert. Aus den Überständen der Zentrifugation wird die Einzelstrang-DNA nach dem von Amersham [M13 Cloning and Sequencing Handbook, 1984] angegebenen Verfahren gewonnen. Aus den abzentrifugierten Zellen wird die Doppelstrang-DNA nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) isoliert. Die Doppelstrang-DNA der aus MJSS'030 hervorgegangenen verkürzten Phagen wird mit BglII, diejenige der aus MJSS'031 hervorgegangenen Phagen mit EcoRI und SalI verdaut. Durch anschließende elektrophoretische Auftrennung der Bruchstücke auf einem 2%igen Agarosegel nach T. Maniatis et al. (vgl. oben) wird die Größe der jeweiligen Deletion bestimmt.

c) Sequenzierung der Einzelstrang-DNA

Von der oben erhaltenen Einzelstrang-DNA der verkürzten Phagen sowie von der in Beispiel 12 hergestellten Einzelstrang-DNA von MJSS'030 und MJSS'031 wird die Basensequenz nach dem literaturbekannten Verfahren der

Didesoxynukleotid-Sequenzierung [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463 (1977)] bestimmt. Dabei wird die von Amersham gegebene Vorschrift [M13 Cloning and Sequencing Handbook, 1094] befolgt. Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wird ein 55 cm langes Gel mit einer von 0.1 mm bis 0.4 mm ansteigenden Dicke verwendet. Die identifizierten DNA-Sequenzen der verkürzten Phagen werden mit Hilfe eines Computer-Programms [C. Queen et al. Nucl. Acids Res. 12:581 (1984)] an überlappenden Regionen zu einer DNA-Sequenz zusammengefügt, die den gesamten Abschnitt zwischen der BamHI-Schnittstelle und der SalI-Schnittstelle des in M13tg130 bzw. M13tg131 klonierten Inserts umfaßt. Durch Vergleich der beiden so erhaltenen komplementären DNA-Stränge wird die Basensequenz bestätigt.

d) Eigenschaften der sequenzierten DNA

Mit Hilfe des obengenannten Computerprogramms werden alle Eigenschaften der DNA ermittelt, die sich unmittelbar aus der Basenfolge ergeben. Darunter sind als wichtigste zu nennen: die Lage der Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen, die Lage und Länge der offenen Leserahmen als mögliche kodierende Regionen eines Gens, die Häufigkeit bestimmter Basen und deren Verteilung, und das Vorkommen bestimmter funktioneller DNA-Sequenzen. Die Analyse der DNA-Sequenz zeigt einen offenen Leserahmen, dessen Lage, Länge und Transkriptionsrichtung mit den in den Beispielen 14 und 15 beschriebenen Eigenschaften des tfdA-Gens übereinstimmt. Er beginnt an einem GTG-Startkodon mit der Base Nr. 748 und endet vor einem TAG-Stopkodon mit der Base Nr. 1608 und hat somit eine Länge von 861 Basen, welche mit der Länge des von tfdA kodierten Proteins (Beispiel 15) korrespondiert. Die Insertion von Transkriptions- und Translationsstopsignalen in die einzige BglII-Schnittstelle des sequenzierten Fragments, wie es die Klonierung des Omega-Fragments in pTJS'X535 darstellt (Beispiel 11), verkürzt diesen offenen Leserahmen rechnerisch auf 768 Basen, was mit der Expression eines verkürzten und enzymatisch inaktiven Genprodukts durch das Plasmid pTJS'X535omega (Beispiel 15) übereinstimmt.

10 20 30 40 50 60
 GGATCCTGTCTCAGCTGGCGCGAATGCTCGAACCCGCTGCGATATAACAGCCGTTCTAG
 70 80 90 100 110 120
 TGCACGGTGCCTCCACCGTGATTCCAGGCTCCTGGGGTAGAAGGGGCCGACACCGAGATGG
 130 140 150 160 170 180
 ATGGTGCCGGCACGCAGGGCCTCGATCTGCCGCACCTGGGCATCAGGGCCAGAGACAGC
 190 200 210 220 230 240
 GTCGCCCCCGGGACCGCCTGGGTGAACGGCATGGAGCAATGCCGGACGGTCTGGTAGATC
 250 260 270 280 290 300
 GCCGTGCCGAGGTAGCCGATATCGAGTTGGCCGATCTGCCCGGCTGGCGGGCGGGAC
 310 320 330 340 350 360
 CGGTCCACCGAACGTCCGACCCAGTTCGAGCATGCCCGTGCATCTCGAGAAACCGGGCC
 370 380 390 400 410 420
 CGGGCGGGCGTGAGCTGCACGCCGCCGCGCTGGCGCTCGAACAAACAACACGGCCAGATGC
 430 440 450 460 470 480
 TGTTCGAGCCGCGTGAATCTGTCGCGTACCGGGGGCTGGAAATATGCAGCCGCCCGCG
 490 500 510 520 530 540
 CGGGCACCGACGTTGCCCTCCGCCGGCAGCAACGAAATAGCGAACGCTGTCGAAACTCC
 550 560 570 580 590 600
 ATTCTTCACTCGTGGCTGGCTCCGGCTGCCGGAGAGCCATACCGATCCGTATCGCT
 610 620 630 640 650 660
 CGCGCTGATGGAAGGTATTAGACCATATGGCCCGGCATTCTAGACTACCGCCATGATAA
 670 680 690 700 710 720
 AACTCGGCTGCTCTCGTCTGCTGGAACATCTCAGGGCGCGTGGCGCTTGGAA
 730 740 750 760 770 780
 ACAGTCTCTAGAAAAGGAGCAAAAAGTGAAGCGTCGTCGCAAATCCCCCTCATCCTCTT
 790 800 810 820 830 840
 TTCCGCCGAGGGCTCGAACGACATCGACCTTCGAGAGGGCTTGGGTTCGACCGAGGTCCGA
 850 860 870 880 890 900
 GAGATCGAACGGCTAATGGACCGAGAAGTCGGTGCCTGGTGTTCGGGGCAGCCCTGAGT
 910 920 930 940 950 960
 CAGGATCAGCAGATGCCCTCGCGCGCAATTCTGGGCCACTCGAACGGCGTTCATCAAG
 970 980 990 1000 1010 1020
 GTCAATCAAAGACCTTCGAGATTCAAGTACGCCAGTTGGCGGACATCTCGAACGTCAGT
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 CTCCGACGGCAAGGTGGCGAACGGGATGGCGCGAGGTGGTCGGAACTTCGCGAACCGAG
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 CTCTGGCACAGCGACAGCTCCCTTCAGCAACCTGCTGCCCGCTACTCGATGCTCTCCCG
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GTGGTGGTTCCGCCGTCGGCGGGCACACCGAGTTCTGCGACATGCGTGGGCATACGAC
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 CGGCTGCCCTCGGGACCTCCAATCCGAGTTGGAAGGGCTGCCGTGCCGAGCACTACGGCACTG

1280 1290 1300 1310 1320
 AACTCCCGCTTCCTGCTCGGCCACCCGACTATTGGAAGCGCAACGCAATGCCATGCCG
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 CCGGTCAACTGGCCGCTGGTCGAACCCACGCCGGCTCCGGCGCAAGTTCTTCATC
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 GGGCGGCAACGGAGCCACGTCGAAGGCCTCCGGTGGCCGAAGGCCGGATGCTGCTGCG
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 GAGCTTCTCGAGCACGCGACACAGCGGGATTGTTGACCGGCATCGCTGGAACGTGGGA
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 GATCTGGTGATGTGGGACAACCGCTGGTTCTCACCGCCGGACGCAGGTACGACATCTG
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 GCCAGGCCTGAGCTGCGCCGGCGACCACCCCTGGACGATGCCGTCTAGCGCACGCCA
 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 TGGCGCACGCCCTTCGCGAAGGCCCCACAAGATGTACGCAACCTGATCAGCGGCAGC
 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 CGTAGCCTGGACGGCGACACCTGGCGAGCGCGTCTCGAGCGGGCGGCCCTGGCG
 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 GCATGGGATTGAGGCCGGTGTGTCGTCGCCATCCTCATGCGCAATGACTTTCCGGTG
 1810 1820 1830 1840 1850 1860
 CTCGAAATGACCGCTGGCCCGAACCGCGCCGGCATCGTTCGGTGCCTTGAACCTGGCA
 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 CGCAACCGGGACGAGATCGCCTCATCCTCGAGGACTGCAAAGCGCGTGTGCTCGCG
 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 CACACCGATCTGCTCAAGGGCGTTGCATCCGCGGTGCCCGAGGCCTGCAAGGTGCTGGAA
 1990 2000 2010 2020 2030 2040
 GCCGCGTCGCCGCCCGAGATCCGGCAGGCCTATCGGCTGTCCGATGCGTCGTGACCGGC
 2050
 AACCCGGGCACGGTCGAC

Abb.10b

Formblatt für die Hinterlegung von Mikroorganismen

M3

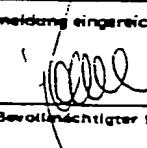
Internationales Aktenzeichen: PCT/

MIKROORGANISMEN	
Angaben über den auf Seite 13..... Zeile 12-26 der Beschreibung genannten Mikroorganismus ¹	
A. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG²	
Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt angegeben <input type="checkbox"/>	
Name der Hinterlegungsstelle ³	
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen	
Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land) ⁴	
Grisebachstr. 8 D - 3400 Göttingen	
Datum der Hinterlegung ⁵	Eingangsnummer ⁶
28. August 1986	DSM 3829 - 3843
B. WEITERE ANGABEN⁷ (die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt <input type="checkbox"/>	
C. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN ⁸ (falls die Angaben nicht alle Bestimmungsstaaten betreffen)	
D. NACHREICHUNG VON ANGABEN ⁹	
Folgende Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht ⁹ (allgemeine Bezeichnung der Angaben, z.B. "Eingangsnummer der Hinterlegung")	
E. <input checked="" type="checkbox"/> Dieses Blatt wurde zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht (vom Anmeldeamt nachzuprüfen)	
 Dipl.-Verwaltungswirt (Bevollmächtigter Beamter) R. KONVALIN Regierungsaufmann	
<input type="checkbox"/> Datum des Eingangs dieses (vom Anmelder nachgereichten) Blattes beim Internationalen Büro ¹⁰	
(Bevollmächtigter Beamter)	

Formblatt für die Hinterlegung von Mikroorganismen

Internationales Aktenzeichen: PCT/ DE 87/00392

M3

MIKROORGANISMEN	
Angaben über den auf Seite <u>13</u> Zeile <u>12</u> der Beschreibung genannten Mikroorganismus ¹	
A. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG²	
Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt angegeben <input checked="" type="checkbox"/> <u>3</u>	
Name der Hinterlegungsstelle ⁴	
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM)	
Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land) ⁴	
Gisebachstr. 8, D- 3400 Göttingen, Deutschland	
Datum der Hinterlegung ⁵	Eingangsnr. ⁶
28.08.1986	DSM 3829
B. WEITERE ANGABEN⁷ (die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt) <input type="checkbox"/>	
Für diejenigen Bestimmungen, in denen um ein europäisches Patent nachgesucht wird, wird bis zur Veröffentlichung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents oder bis zu dem Tag, an dem die Anmeldung zurückgewiesen oder zurückgenommen wird oder als zurückgenommen gilt, der Zugang zu dem hinterlegten Mikroorganismus nur durch Herausgabe einer Probe des Mikroorganismus an einen Sachverständigen hergestellt, der von der Person, die die Probe beantragt, benannt wird (Regel 28 Absatz 4 EPÜ).	
C. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN³ (falls die Angaben nicht alle Bestimmungsstaaten betreffen)	
D. NACHREICHUNG VON ANGABEN⁸	
Folgende Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht ⁹ (allgemeine Bezeichnung der Angaben, z.B. "Eingangsnummer der Hinterlegung")	
E. <input checked="" type="checkbox"/> Dieses Blatt wurde zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht (vom Anmeldeamt nachzuprüfen) am <u>13.11.87</u>	
 Dipl.-Verwaltungswirt (Bewilligter Beamter) <u>R. KONVALIN</u> Regierungsaufmann	
<input type="checkbox"/> Datum des Eingangs dieses (vom Anmelder nachgereichten) Blattes beim Internationalen Büro ¹⁰	
<hr/> (Bewilligter Beamter)	

Formblatt für die Hinterlegung von Mikroorganismen

DE 87/00392

M3

Internationales Aktenzeichen: PCT/

MIKROORGANISMEN

Angaben über den auf Seite 13, Zeile 13 der Beschreibung genannten Mikroorganismus¹

A. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG²

Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt angegeben 3

Name der Hinterlegungsstelle⁴

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM)

Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land)⁴

Gisebachstr. 8, D- 3400 Göttingen, Deutschland

Datum der Hinterlegung⁵

28.08.1986

Eingangsnummer⁶

DSM 3830

B. WEITERE ANGABEN⁷ (die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt

Für diejenigen Bestimmungen, in denen um ein europäisches Patent nachgesucht wird, wird bis zur Veröffentlichung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents oder bis zu dem Tag, an dem die Anmeldung zurückgewiesen oder zurückgenommen wird oder als zurückgenommen gilt, der Zugang zu dem hinterlegten Mikroorganismus nur durch Herausgabe einer Probe des Mikroorganismus an einen Sachverständigen hergestellt, der von der Person, die die Probe beantragt, benannt wird (Regel 28 Absatz 4 EPU).

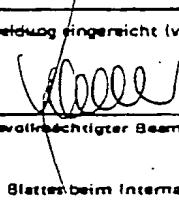
C. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN⁸ (falls die Angaben nicht alle Bestimmungsstaaten betreffen)

D. NACHREICHUNG VON ANGABEN⁸

Folgende Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht⁹ (allgemeine Bezeichnung der Angaben, z.B. "Eingangsnummer der Hinterlegung")

E. Dieses Blatt wurde zusammen mit der Internationalen Anmeldung eingereicht (vom Anmeldeamt nachzuprüfen)

am 4. 11. 87


(Bevollmächtigter Beamter)

Dipl.-Verwaltungswirt
R. KONVALINT
Regierungsaufmann

Datum des Eingangs dieses (vom Anmelder nachgesuchten) Blattes beim Internationalen Büro¹⁰

(Bevollmächtigter Beamter)

Formblatt für die Hinterlegung von Mikroorganismen

DE 87/00392

M3

Internationales Aktenzeichen: PCT/

MIKROORGANISMEN

Angaben über dem auf Seite ... 13 ... Zeile ... 14 ... der Beschreibung genannten Mikroorganismus¹

A. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG²

Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt angegeben

Name der Hinterlegungsstelle⁴

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM)

Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land)⁴

Gisebachstr. 8, D- 3400 Göttingen, Deutschland

Datum der Hinterlegung⁵

28.08.1986

Eingangsnummer⁶

DSM 3831

B. WEITERE ANGABEN⁷ (die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt

Für diejenigen Bestimmungen, in denen um ein europäisches Patent nachgesucht wird, wird bis zur Veröffentlichung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents oder bis zu dem Tag, an dem die Anmeldung zurückgewiesen oder zurückgenommen wird oder als zurückgenommen gilt, der Zugang zu dem hinterlegten Mikroorganismus nur durch Herausgabe einer Probe des Mikroorganismus an einen Sachverständigen hergestellt, der von der Person, die die Probe beantragt, benannt wird (Regel 28 Absatz 4 EPÜ).

C. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN³ (falls die Angaben nicht alle Bestimmungsstaaten betreffen)

D. NACHREICHUNG VON ANGABEN⁸

Folgende Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht⁹ (allgemeine Bezeichnung der Angaben, z.B. "Eingangsnummer der Hinterlegung")

E. Dieses Blatt wurde zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht (vom Anmeldeamt nachzuprüfen)

am 21.8.87

Dipl.-Ing. ... 1987

R. K. ...

(Bevollmächtigter Beamter)

Regierung ...

Datum des Eingangs dieses (vom Anmelder nachgereichten) Blattes beim Internationalen Büro¹⁰

(Bevollmächtigter Beamter)

Formblatt für die Hinterlegung von Mikroorganismen

M3

Internationales Aktenzeichen: PCT/

DE 87/00392

MIKROORGANISMEN

Angaben über den auf Seite 13 Zeile 15 der Beschreibung genannten Mikroorganismus¹

A. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG²

Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt angegeben

Name der Hinterlegungsstelle⁴

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM)

Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land)⁴

Gisebachstr. 8, D- 3400 Göttingen, Deutschland

Datum der Hinterlegung⁵

28.08.1986

Eingangsnummer⁶

DSM 3832

B. WEITERE ANGABEN⁷ (die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt

Für diejenigen Bestimmungen, in denen um ein europäisches Patent nachgesucht wird, wird bis zur Veröffentlichung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents oder bis zu dem Tag, an dem die Anmeldung zurückgewiesen oder zurückgenommen wird oder als zurückgenommen gilt, der Zugang zu dem hinterlegten Mikroorganismus nur durch Herausgabe einer Probe des Mikroorganismus an einen Sachverständigen hergestellt, der von der Person, die die Probe beantragt, benannt wird (Regel 28 Absatz 4 EPÜ).

C. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN³ (falls die Angaben nicht alle Bestimmungsstaaten betreffen)

D. NACHREICHUNG VON ANGABEN⁸

Folgende Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht⁹ (allgemeine Bezeichnung der Angaben, z.B. "Eingangsnummer der Hinterlegung")

E. Dieses Blatt wurde zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht (vom Anmeldeamt nachzuprüfen)

am

Völle Dipl.-Verwaltungswirt
(Bewilligter Beamter)

R. KONVALIN

Regierungschmittmann

Datum des Eingangs dieses (vom Anmelder nachgereichten) Blattes beim Internationalen Büro¹⁰

(Bewilligter Beamter)

PCT-Leitfaden für Anmelder – Band 1 – Anlage M 3

Formblatt für die Hinterlegung von Mikroorganismen

M3

Internationales Aktenzeichen: PCT/ DE 87/00392

MIKROORGANISMEN

16

Angaben über den auf Seite 13..... Zeile der Beschreibung genannten Mikroorganismus¹

A. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG²

Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt angegeben 3

Name der Hinterlegungsstelle⁴

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM)

Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land)⁴

Gisebachstr. 8, D- 3400 Göttingen, Deutschland

Datum der Hinterlegung ⁵	Eingangsnummer ⁶
28.08.1986	DSM 3833

B. WEITERE ANGABEN⁷ (die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt

Für diejenigen Bestimmungen, in denen um ein europäisches Patent nachgesucht wird, wird bis zur Veröffentlichung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents oder bis zu dem Tag, an dem die Anmeldung zurückgewiesen oder zurückgenommen wird oder als zurückgenommen gilt, der Zugang zu dem hinterlegten Mikroorganismus nur durch Herausgabe einer Probe des Mikroorganismus an einen Sachverständigen hergestellt, der von der Person, die die Probe beantragt, benannt wird (Regel 28 Absatz 4 EPÜ).

C. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN³ (falls die Angaben nicht alle Bestimmungsstaaten betreffen)

D. NACHREICHUNG VON ANGABEN⁸

Folgende Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht⁹ (allgemeine Bezeichnung der Angaben, z.B. "Eingangsnummer der Hinterlegung")

E. Dieses Blatt wurde zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht (vom Anmeldeamt nachzuprüfen)

am 13.11.87

Vögel

(Bevollmächtigter Beamter)

(Bevollmächtigter Beamter)

Datum des Eingangs dieses (vom Anmelder nachgereichten) Blattes beim Internationalen Büro¹⁰

Formblatt für die Hinterlegung von Mikroorganismen

M3

Internationales Aktenzeichen: PCT/ DE 87/00392

MIKROORGANISMEN

Angaben über den auf Seite ... 13, Zeile ... 17 ... der Beschreibung genannten Mikroorganismus¹

A. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG²

Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt angegeben 3

Name der Hinterlegungsstelle⁴

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM)

Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land)⁴

Gisebachstr. 8, D- 3400 Göttingen, Deutschland

Datum der Hinterlegung⁵

28.08.1986

Eingangsnummer⁶

DSM 3834

B. WEITERE ANGABEN⁷ (die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt

Für diejenigen Bestimmungen, in denen um ein europäisches Patent nachgesucht wird, wird bis zur Veröffentlichung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents oder bis zu dem Tag, an dem die Anmeldung zurückgewiesen oder zurückgenommen wird oder als zurückgenommen gilt, der Zugang zu dem hinterlegten Mikroorganismus nur durch Herausgabe einer Probe des Mikroorganismus an einen Sachverständigen hergestellt, der von der Person, die die Probe beantragt, benannt wird (Regel 28 Absatz 4 EPÜ).

C. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN³ (falls die Angaben nicht alle Bestimmungsstaaten betreffen)

D. NACHREICHUNG VON ANGABEN⁸

Folgende Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht⁹ (allgemeine Bezeichnung der Angaben, z.B. "Eingangsnummer der Hinterlegung")

E. Dieses Blatt wurde zusammen mit der Internationalen Anmeldung eingereicht (vom Anmeldeamt nachzuprüfen)

Am 19.11.87


Dipl.-Verwaltungswirt
R. KONVALIN
(Bevollmächtigter Beamter)
Regierungsamtmann

Datum des Eingangs dieses (vom Anmelder nachgereichten) Blattes beim Internationalen Büro¹⁰

(Bevollmächtigter Beamter)

Formblatt für die Hinterlegung von Mikroorganismen

M3

Internationales Aktenzeichen: PCT/

DE 87/00392

MIKROORGANISMEN

18

Angaben über den auf Seite 13..... Zeile der Beschreibung genannten Mikroorganismus¹

A. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG²

Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt angegeben 3

Name der Hinterlegungsstelle⁴

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM)

Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land)⁴

Gisebachstr. 8, D- 3400 Göttingen, Deutschland

Datum der Hinterlegung⁵

28.08.1986

Eingangsnummer⁶

DSM 3835

B. WEITERE ANGABEN⁷ (die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt

Für diejenigen Bestimmungen, in denen um ein europäisches Patent nachgesucht wird, wird bis zur Veröffentlichung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents oder bis zu dem Tag, an dem die Anmeldung zurückgewiesen oder zurückgenommen wird oder als zurückgenommen gilt, der Zugang zu dem hinterlegten Mikroorganismus nur durch Herausgabe einer Probe des Mikroorganismus an einen Sachverständigen hergestellt, der von der Person, die die Probe beantragt, benannt wird (Regel 28 Absatz 4 EPÜ).

C. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN⁸ (falls die Angaben nicht alle Bestimmungsstaaten betreffen)

D. NACHREICHUNG VON ANGABEN⁹

Folgende Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht⁹ (allgemeine Bezeichnung der Angaben, z.B. "Eingangsnummer der Hinterlegung")

E. Dieses Blatt wurde zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht (vom Anmeldeamt nachzuprüfen)

Am 18.11.86

Weller

Dipl.-Verwaltungsrat

(Bevollmächtigter Beamter)

Regist. Nr. 111111

Datum des Eingangs dieses (vom Anmelder nachgereichten) Blattes beim Internationalen Büro¹⁰

(Bevollmächtigter Beamter)

Formblatt für die Hinterlegung von Mikroorganismen

M3

Internationales Aktenzeichen: PCT/ DE 87/00392

MIKROORGANISMEN

Angaben über den auf Seite ... 13 Zeile 19. der Beschreibung genannten Mikroorganismus¹

A. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG²

Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt angegeben 3

Name der Hinterlegungsstelle⁴

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM)

Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land)⁴

Gisebachstr. 8, D- 3400 Göttingen, Deutschland

Datum der Hinterlegung⁵

28.08.1986

Eingangsnummer⁶

DSM 3836

B. WEITERE ANGABEN⁷ (die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt

Für diejenigen Bestimmungen, in denen um ein europäisches Patent nachgesucht wird, wird bis zur Veröffentlichung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents oder bis zu dem Tag, an dem die Anmeldung zurückgewiesen oder zurückgenommen wird oder als zurückgenommen gilt, der Zugang zu dem hinterlegten Mikroorganismus nur durch Herausgabe einer Probe des Mikroorganismus an einen Sachverständigen hergestellt, der von der Person, die die Probe beantragt, benannt wird (Regel 28 Absatz 4 EPÜ).

C. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN⁸ (falls die Angaben nicht alle Bestimmungsstaaten betreffen)

D. NACHREICHUNG VON ANGABEN⁹

Folgende Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht⁹ (allgemeine Bezeichnung der Angaben, z.B. "Eingangsnummer der Hinterlegung")

E. Dieses Blatt wurde zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht (vom Anmeldeamt nachzuprüfen)

Am 11.87

Yonelle
(Bevollmächtigter Beamter)

Dipl.-Verwalt.

R. KONIG

Regierungsrat

Datum des Eingangs dieses (vom Anmelder nachgereichten) Blattes beim Internationalen Büro¹⁰

(Bevollmächtigter Beamter)

Formblatt für die Hinterlegung von Mikroorganismen

M3

Internationales Aktenzeichen: PCT/
DE 87/00392

MIKROORGANISMEN

Angaben über den auf Seite 13..... Zeile der Beschreibung genannten Mikroorganismus¹

A. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG²

Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt angegeben ³

Name der Hinterlegungsstelle⁴

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM)

Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land)⁴

Gisebachstr. 8, D- 3400 Göttingen, Deutschland

Datum der Hinterlegung⁵

28.08.1986

Eingangsnummer⁶

DSM 3837

B. WEITERE ANGABEN⁷ (die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt

Für diejenigen Bestimmungen, in denen um ein europäisches Patent nachgesucht wird, wird bis zur Veröffentlichung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents oder bis zu dem Tag, an dem die Anmeldung zurückgewiesen oder zurückgenommen wird oder als zurückgenommen gilt, der Zugang zu dem hinterlegten Mikroorganismus nur durch Herausgabe einer Probe des Mikroorganismus an einen Sachverständigen hergestellt, der von der Person, die die Probe beantragt, benannt wird (Regel 28 Absatz 4 EPÜ).

C. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN³ (falls die Angaben nicht alle Bestimmungsstaaten betreffen)

D. NACHREICHUNG VON ANGABEN⁸

Folgende Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht⁹ (allgemeine Bezeichnung der Angaben, z.B. "Eingangsnummer der Hinterlegung")

E. Dieses Blatt wurde zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht (vom Anmeldeamt nachzuprüfen)

Am

37


(Bevollmächtigter Beamter)

Dip.

1987

Begla.

Datum des Eingangs dieses (vom Anmelder nachgereichten) Blattes beim Internationalen Büro¹⁰


(Bevollmächtigter Beamter)

Formblatt für die Hinterlegung von Mikroorganismen

M3

Internationales Aktenzeichen: PCT/

DE 87/00392

MIKROORGANISMEN

21

Angaben über den auf Seite 13, Zeile der Beschreibung genannten Mikroorganismus¹

A. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG²

Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt angegeben ³

Name der Hinterlegungsstelle⁴

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM)

Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land)⁴

Gisebachstr. 8, D- 3400 Göttingen, Deutschland

Datum der Hinterlegung⁵

28.08.1986

Eingangsnummer⁶

DSM 3838

B. WEITERE ANGABEN⁷ (die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt.

Für diejenigen Bestimmungen, in denen um ein europäisches Patent nachgesucht wird, wird bis zur Veröffentlichung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents oder bis zu dem Tag, an dem die Anmeldung zurückgewiesen oder zurückgenommen wird oder als zurückgenommen gilt, der Zugang zu dem hinterlegten Mikroorganismus nur durch Herausgabe einer Probe des Mikroorganismus an einen Sachverständigen hergestellt, der von der Person, die die Probe beantragt, benannt wird (Regel 28 Absatz 4 EPÜ).

C. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN⁸ (falls die Angaben nicht alle Bestimmungsstaaten betreffen)

D. NACHREICHUNG VON ANGABEN⁸

Folgende Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht⁹ (allgemeine Bezeichnung der Angaben, z.B. "Eingangsnummer der Hinterlegung")

E. Dieses Blatt wurde zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht (vom Anmeldeamt nachzuprüfen)

an

Wolffel Dipl.-Verwaltungswirt

R. KÖHLER

(Bevollmächtigter Beamter)

Regierung von Niedersachsen

Datum des Eingangs dieses (vom Anmelder nachgereichten) Blattes beim Internationalen Büro¹⁰

(Bevollmächtigter Beamter)

Formblatt für die Hinterlegung von Mikroorganismen

M3

Internationales Aktenzeichen: PCT/

DE 87/00392

MIKROORGANISMEN

Angaben über den auf Seite 13..... Zeile 22 der Beschreibung genannten Mikroorganismus.¹

A. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG²

Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt angegeben 3

Name der Hinterlegungsstelle⁴

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM)

Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land)⁴

Gisebachstr. 8, D- 3400 Göttingen, Deutschland

Datum der Hinterlegung⁵

28.08.1986

Eingangsnummer⁶

DSM 3839

B. WEITERE ANGABEN⁷ (die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt

Für diejenigen Bestimmungen, in deren um ein europäisches Patent nachgesucht wird, wird bis zur Veröffentlichung des Hirweises auf die Erteilung des europäischen Patents oder bis zu dem Tag, an dem die Anmeldung zurückgewiesen oder zurückgenommen wird oder als zurückgenommen gilt, der Zugang zu dem hinterlegten Mikroorganismus nur durch Herausgabe einer Probe des Mikroorganismus an einen Sachverständigen hergestellt, der von der Person, die die Probe beantragt, benannt wird (Regel 28 Absatz 4 EPU).

C. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN³ (falls die Angaben nicht alle Bestimmungsstaaten betreffen)

D. NACHREICHUNG VON ANGABEN⁸

Folgende Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht⁹ (allgemeine Bezeichnung der Angaben, z.B. "Eingangsnummer der Hinterlegung")

E. Dieses Blatt wurde zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht (vom Anmeldeamt nachzuprüfen)

an 13.11.87

V. (Signature)
(Bevollmächtigter Beamter)

Regierung

Datum des Eingangs dieses (vom Anmelder nachgereichten) Blattes beim Internationalen Büro¹⁰

(Bevollmächtigter Beamter)

Formblatt für die Hinterlegung von Mikroorganismen

M3

Internationales Aktenzeichen: PCT/

DE 87/00392

MIKROORGANISMEN

Angaben über den auf Seite 13, Zeile 23 der Beschreibung genannten Mikroorganismus.¹

A. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG²

Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt angegeben 3

Name der Hinterlegungsstelle⁴

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM)

Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land)⁴

Gisebachstr. 8, D- 3400 Göttingen, Deutschland

Datum der Hinterlegung⁵

28.08.1986

Eingangsnummer⁶

DSM 3840

B. WEITERE ANGABEN⁷ (die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt

Für diejenigen Bestimmungen, in denen um ein europäisches Patent nachgesucht wird, wird bis zur Veröffentlichung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents oder bis zu dem Tag, an dem die Anmeldung zurückgewiesen oder zurückgenommen wird oder als zurückgenommen gilt, der Zugang zu dem hinterlegten Mikroorganismus nur durch Herausgabe einer Probe des Mikroorganismus an einen Sachverständigen hergestellt, der von der Person, die die Probe beantragt, benannt wird (Regel 28 Absatz 4 EPÜ).

C. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN⁸ (falls die Angaben nicht alle Bestimmungsstaaten betreffen)

D. NACHREICHUNG VON ANGABEN⁹

Folgende Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht⁹ (allgemeine Bezeichnung der Angaben, z.B. "Eingangsnummer der Hinterlegung")

E. Dieses Blatt wurde zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht (vom Anmeldeamt nachzuprüfen)

am 14.8.86

Wolle Dipl.-Verwaltungswirt
R. KÖHLER
(Bevollmächtigter Beamter)

Regierungsschreiber

Datum des Eingangs dieses (vom Anmelder nachgereichten) Blattes beim Internationalen Büro¹⁰

(Bevollmächtigter Beamter)

Formblatt für die Hinterlegung von Mikroorganismen

M3

Internationales Aktenzeichen: PCT/

DE 87/00392

MIKROORGANISMEN

Angaben über den auf Seite 13..... Zeile 24..... der Beschreibung genannten Mikroorganismus¹A. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG²Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt angegeben ³Name der Hinterlegungsstelle⁴

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM)

Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land)⁴

Gisebachstr. 8, D- 3400 Göttingen, Deutschland

Datum der Hinterlegung⁵

28.08.1986

Eingangsnummer⁶

DSM 3841

B. WEITERE ANGABEN⁷ (die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt)

Für diejenigen Bestimmungen, in denen um ein europäisches Patent nachgesucht wird, wird bis zur Veröffentlichung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents oder bis zu dem Tag, an dem die Anmeldung zurückgewiesen oder zurückgenommen wird oder als zurückgenommen gilt, der Zugang zu dem hinterlegten Mikroorganismus nur durch Herausgabe einer Probe des Mikroorganismus an einen Sachverständigen hergestellt, der von der Person, die die Probe beantragt, benannt wird (Regel 28 Absatz 4 EPÜ).

C. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN³ (falls die Angaben nicht alle Bestimmungsstaaten betreffen)D. NACHREICHUNG VON ANGABEN⁸

Folgende Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht⁹ (allgemeine Bezeichnung der Angaben, z.B. "Eingangsnummer der Hinterlegung")

E. Dieses Blatt wurde zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht (vom Anmeldeamt nachzuprüfen)

am 28.08.86

(Bevollmächtigter Beamter)


 Dipl.-Vivariumangest.
 (Bevollmächtigter Beamter)

R. G. G. G.

Datum des Eingangs dieses (vom Anmelder nachgesuchten) Blattes beim Internationalen Büro¹⁰

(Bevollmächtigter Beamter)

Formblatt für die Hinterlegung von Mikroorganismen

M3

Internationales Aktenzeichen: PCT/ DE 87/00392

MIKROORGANISMEN

Angaben über den auf Seite . 13 , Zeile 25 . der Beschreibung genannten Mikroorganismus¹

A. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG²

Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt angegeben 3

Name der Hinterlegungsstelle⁴

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM)

Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land)⁴

Gisebachstr. 8, D- 3400 Göttingen, Deutschland

Datum der Hinterlegung⁵

28.08.1986

Eingangsnummer⁶

DSM 3842

B. WEITERE ANGABEN⁷ (die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt)

Für diejenigen Bestimmungen, in denen um ein europäisches Patent nachgesucht wird, wird bis zur Veröffentlichung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents oder bis zu dem Tag, an dem die Anmeldung zurückgewiesen oder zurückgenommen wird oder als zurückgenommen gilt, der Zugang zu dem hinterlegten Mikroorganismus nur durch Herausgabe einer Probe des Mikroorganismus an einen Sachverständigen hergestellt, der von der Person, die die Probe beantragt, benannt wird (Regel 28 Absatz 4 EPÜ).

C. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN³ (falls die Angaben nicht alle Bestimmungsstaaten betreffen)

D. NACHREICHUNG VON ANGABEN⁸

Folgende Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht⁹ (allgemeine Bezeichnung der Angaben, z.B. "Eingangsnummer der Hinterlegung")

E. Dieses Blatt wurde zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht (vom Anmeldeamt nachzuprüfen)

am 13.11.87

Yells
(Bevollmächtigter Beamter)

Datum des Eingangs dieses (vom Anmelder nachgereichten) Blattes beim Internationalen Büro¹⁰

(Bevollmächtigter Beamter)

Formblatt für die Hinterlegung von Mikroorganismen

M3

Internationales Aktenzeichen: PCT/

DE 87/00392

MIKROORGANISMEN

26 Angaben über den auf Seite 13..... Zeile der Beschreibung genannten Mikroorganismus¹

A. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG²

Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt angegeben 3

Name der Hinterlegungsstelle⁴

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM)

Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land)⁴

Gisebachstr. 8, D- 3400 Göttingen, Deutschland

Datum der Hinterlegung⁵

28.08.1986

Eingangsnummer⁶

3843

B. WEITERE ANGABEN⁷ (die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt)

Für diejenigen Bestimmungen, in denen um ein europäisches Patent nachgesucht wird, wird bis zur Veröffentlichung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents oder bis zu dem Tag, an dem die Anmeldung zurückgewiesen oder zurückgenommen wird oder als zurückgenommen gilt, der Zugang zu dem hinterlegten Mikroorganismus nur durch Herausgabe einer Probe des Mikroorganismus an einen Sachverständigen hergestellt, der von der Person, die die Probe beantragt, benannt wird (Regel 28 Absatz 4 EPÜ).

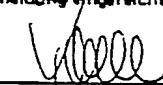
C. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN³ (falls die Angaben nicht alle Bestimmungsstaaten betreffen)

D. NACHREICHUNG VON ANGABEN⁸

Folgende Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht⁹ (allgemeine Bezeichnung der Angaben, z.B. "Eingangsnummer der Hinterlegung")

E. Dieses Blatt wurde zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht (vom Anmeldeamt nachzuprüfen)

Am 19.8.87


Dipl.-Verwaltungssr.
R. KONVALIN

(Bewilligter Beamter) Regierungsmitteln

Datum des Eingangs dieses (vom Anmelder nachgereichten) Blattes beim Internationalen Büro¹⁰

(Bewilligter Beamter)

Patentansprüche:

1. tfdA-2,4-D-monooxygenase-Genmutante Alcaligenes eutrophus JMP 134:Tn 5-2.
2. tfdA-2,4-D-monooxygenase-Genmutante Alcaligenes eutrophus JMP 134:Tn 5-4.
3. Verwendung der tfdA-Mutanten Alcaligenes eutrophus JMP 134:Tn 5-2 und JMP 134:Tn 5-4 zur Identifizierung und Isolierung tfdA-Gene enthaltender Plasmide.
4. Plasmide, enthaltend das tfdA-Gen oder ein mit tfdA im Wesentlichen identisches Gen für 2,4-D-monooxygenase.
5. Rekombinierte DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie die für das 2,4-D spaltende Protein der angegebenen Aminosäuresequenz 1 bis 287 codierende Basensequenz 1 bis 861

GTGAGCGTCGCGCAAATCCCCCTCATCCTCTTTCGCCGAGGGGTCGAAGACATCGAC
 ValSerValValAlaAsnProLeuHisProLeuPheAlaAlaGlyValGluAspIleAsp
 CTTCGAGAGGCCCTGGGTTCGACCGAGGTCCGAGAGATCGAACGGCTAATGGACGAGAAG
 LeuArgGluAlaLeuGlySerThrGluValArgGluIleGluArgLeuMetAspGluLys
 TCGGTGCTGGTGTTCGGGGGCAGCCCTGAGTCAGGATCAGCAGATCGCCTCGCGCGC
 SerValLeuValPheArgGlyGlnProLeuSerGlnAspGlnIleAlaPheAlaArg
 AATTCGGGCCACTCGAAGGCGGTTCATCAAGGTCAATCAAAGACCTTCGAGATTCAAG
 AsnPheGlyProLeuGluGlyGlyPheIleLysValAsnGlnArgProSerArgPheLys
 TACGCGGAGTTGGCGGACATCTCGAACGTCAGTCTCGACGGCAAGGTGGCAACCGCGAT
 TyrAlaGluLeuAlaAspIleSerAsnValSerLeuAspGlyLysValAlaGlnArgAsp
 GCGCGCGAGGTGGTCGGGAACCTCGCGAACCCAGCTCTGGCACAGCGACAGCTCCTTCAG
 AlaArgGluValValGlyAsnPheAlaAsnGlnLeuTrpHisSerAspSerPheGln
 CAACCTGCTGCCGCTACTCGATGCTCTCGCGGGTGGTGGTCCGCCGTCGGCGGCGAC
 GlnProAlaAlaArgTyrSerMetLeuSerAlaValValValProProSerGlyGlyAsp

450 480

ACCGAGTTCTGCGACATGCGTGCAGCATACGACGCGCTGCCTCGGGACCTCCAATCCGAG
ThrGluPheCysAspMetArgAlaAlaTyrAspAlaLeuProArgAspLeuGlnSerGlu

510 540

TTGGAAGGGCTGCGTGCCGAGCACTACGCACTGAACCTCCGCTTCCTGCTCGGCGACACC
LeuGluGlyLeuArgAlaGluHisTyrAlaLeuAsnSerArgPheLeuLeuGlyAspThr

570 600

GACTATTGGAAGCGCAACGCAATGCCATGCCGCCGGTCAACTGGCCGCTGGTTCGAACCC
AspTyrSerGluAlaGlnArgAsnAlaMetProProValAsnTrpProLeuValArgThr

630 660

CACGCCGGCTCCGGCGCAAGTTCTTCATCGCGCGCACGCGAGCCACGTCGAAGGC
HisAlaGlySerGlyArgLysPheLeuPheIleGlyAlaHisAlaSerHisValGluGly

690 720

CTTCCGGTGGCCGAAGGCCGGATGCTGCTTGCAGGCTTCAGAGCACCGCACACAGCGG
LeuProValAlaGluGlyArgMetLeuLeuAlaGluLeuLeuGluHisAlaThrGlnArg

750 780

GAATTCGTGTACCGGCATCGCTGGAACGTGGAGATCTGGTGATGTGGGACAACCGCTGC
GluPheValTyrArgHisArgTrpAsnValGlyAspLeuValMetTrpAspAsnArgCys

810 840

GTTCTTCACCGCGGACGCCAGGTACGACATCTGGCCAGGCCGTGAGCTGCGCCGGCGACC
ValLeuHisArgGlyArgArgTyrAspIleSerAlaArgArgGluLeuArgArgAlaThr

ACCCTGGACGATGCCGTGTC
ThrLeuAspAspAlaValVal

oder ein nach dem genetischen Code für die gleiche Aminosäuresequenz codierendes Äquivalent davon enthält.

6. Plasmid pVJH21
7. Plasmid pGJS3
8. Plasmid pKJS31
9. Plasmid pKJS32
10. Plasmid pKJSB330
11. Plasmid pKJS(X)630
12. Plasmid pKJEΔB130
13. Plasmid pTJS'B435
14. Plasmid pTJS'B436

15. Plasmid pKJS32RH~~A~~S'
16. Plasmid pIJSS'035
17. Plasmid pIJSS'036
18. Plasmid pIJSS'X535
19. Plasmid pIJSS'X536
20. Plasmid pIJSS'X535omega
21. Phagen MJSS'030
22. Phagen MJSS'031
23. Verfahren zur Herstellung von tfdA-Gene enthaltenden Plasmiden, dadurch gekennzeichnet, daß man DNA-Fragmente aus Wildtyp-Bakterien und Plasmidvektoren miteinander verknüpft und tfdA-Gene enthaltende Plasmide über die Expression des Abbaus substituierter oder unsubstituierter Phenoxyessigsäuren in Stämmen, die die entsprechenden Phenole verwerten können, isoliert.
24. Verfahren zur Herstellung von tfdA-Gene oder Teile dieser Gene enthaltenden Plasmiden, dadurch gekennzeichnet, daß man aus gemäß Anspruch 23 erhaltenen Plasmiden Subfragmente, die das intakte tfdA-Gen oder Teile dieses Genes enthaltenen, mit einem Vektorplasmid verknüpft.
25. E. coli-Stämme, enthaltend Plasmide mit einem tfdA-Gen oder mit Teilen dieses Gens.
26. Pseudomonas-Stämme, enthaltend Plasmide mit einem tfdA-Gen oder mit Teilen dieses Gens.
27. Alcaligenes-Stämme, enthaltend Plasmide mit einem tfdA-Gen oder mit Teilen dieses Gens.
28. Verfahren zur Herstellung neuer Bakterienstämme, die tfdA-Gene oder Teile dieser Gene enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß man den betreffenden Stamm nach an sich bekannten Verfahren mit der Plasmid-DNA nach Anspruch 4 transformiert.
29. Verfahren zur Herstellung neuer Bakterienstämme, die tfdA-Gene oder Teile dieser Gene enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß man aus den nach Anspruch 28

erhaltenen Stämmen die Plasmide durch Konjugation auf andere Stämme überträgt.

30. Verwendung von Bakterienstämmen, die tfdA-Gene oder Teile dieser Gene enthalten, zur Herstellung der 2,4-D-monooxygenase.
31. Verwendung von tfdA-Genen oder Teilen dieser Gene enthaltenden Plasmide als Ausgangsprodukt zur Herstellung von 2,4-D-spaltenden lebenden Organismen.

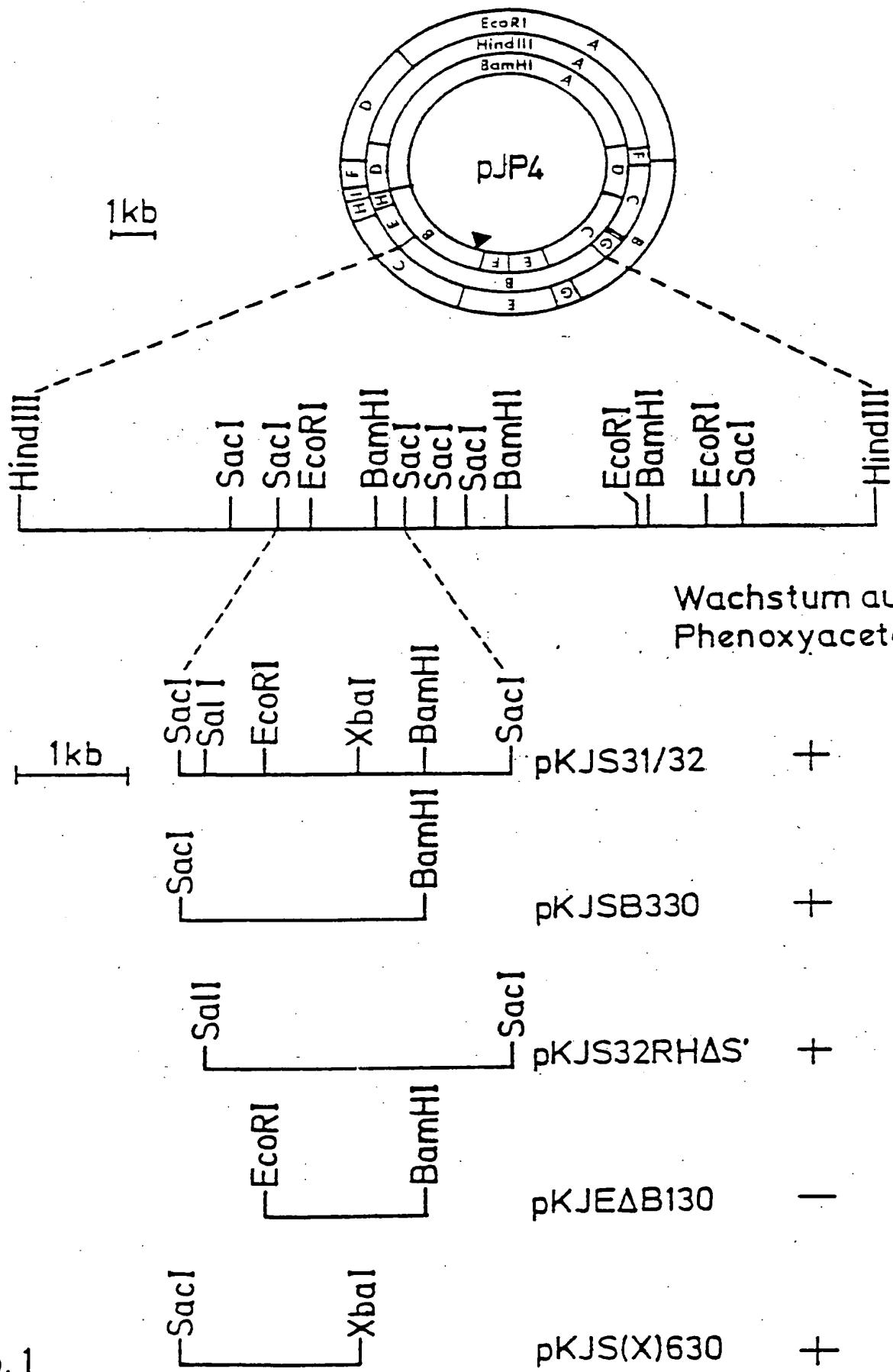


Abb. 1

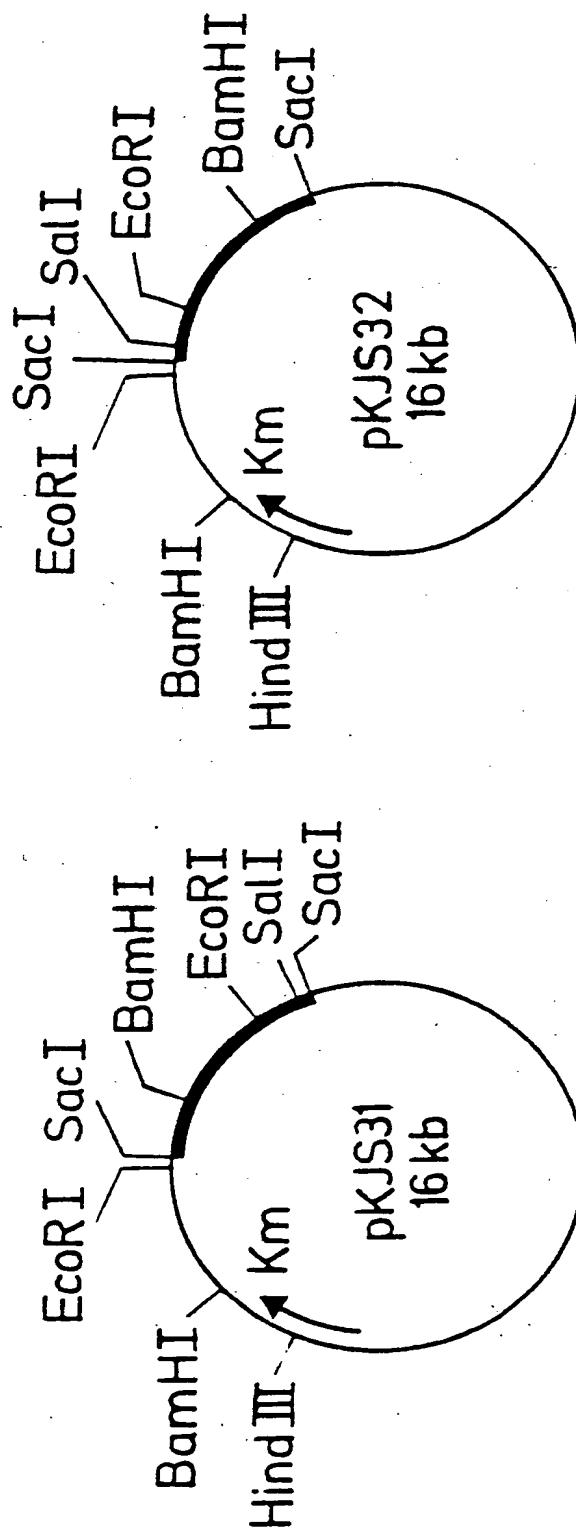
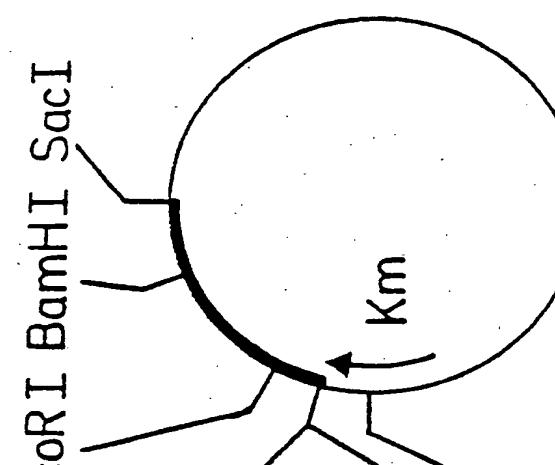
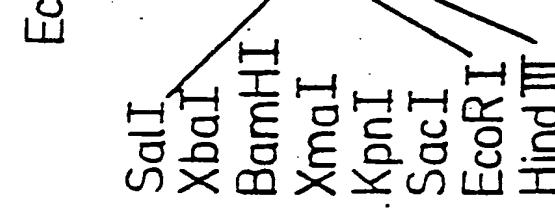


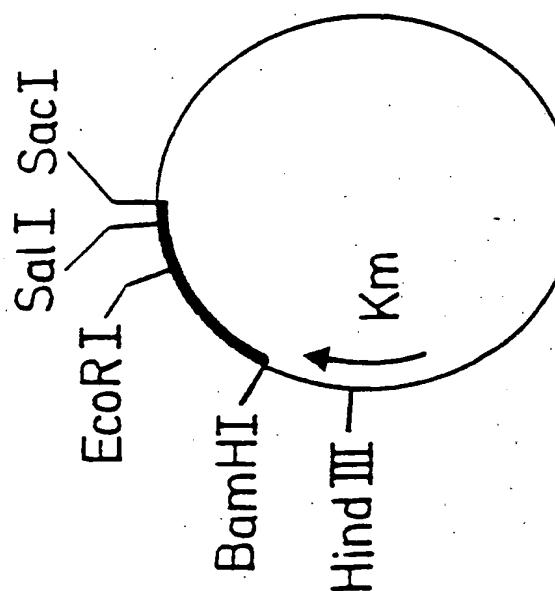
Abb. 2



pKJS32RHΔS'
13.3kb



pKJSB330
13.2kb



pKJEΔB130

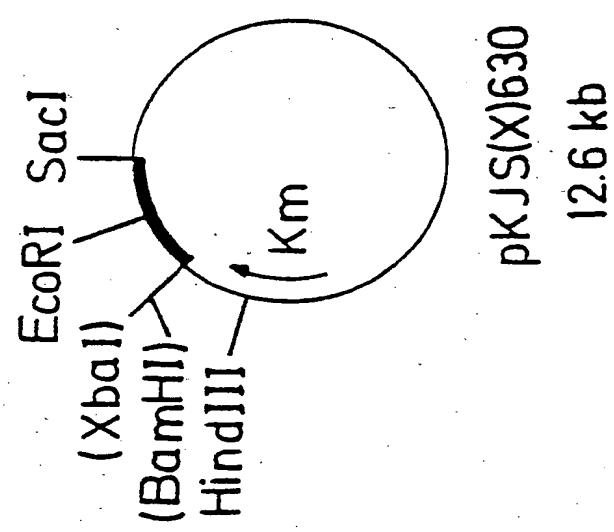


Abb. 4

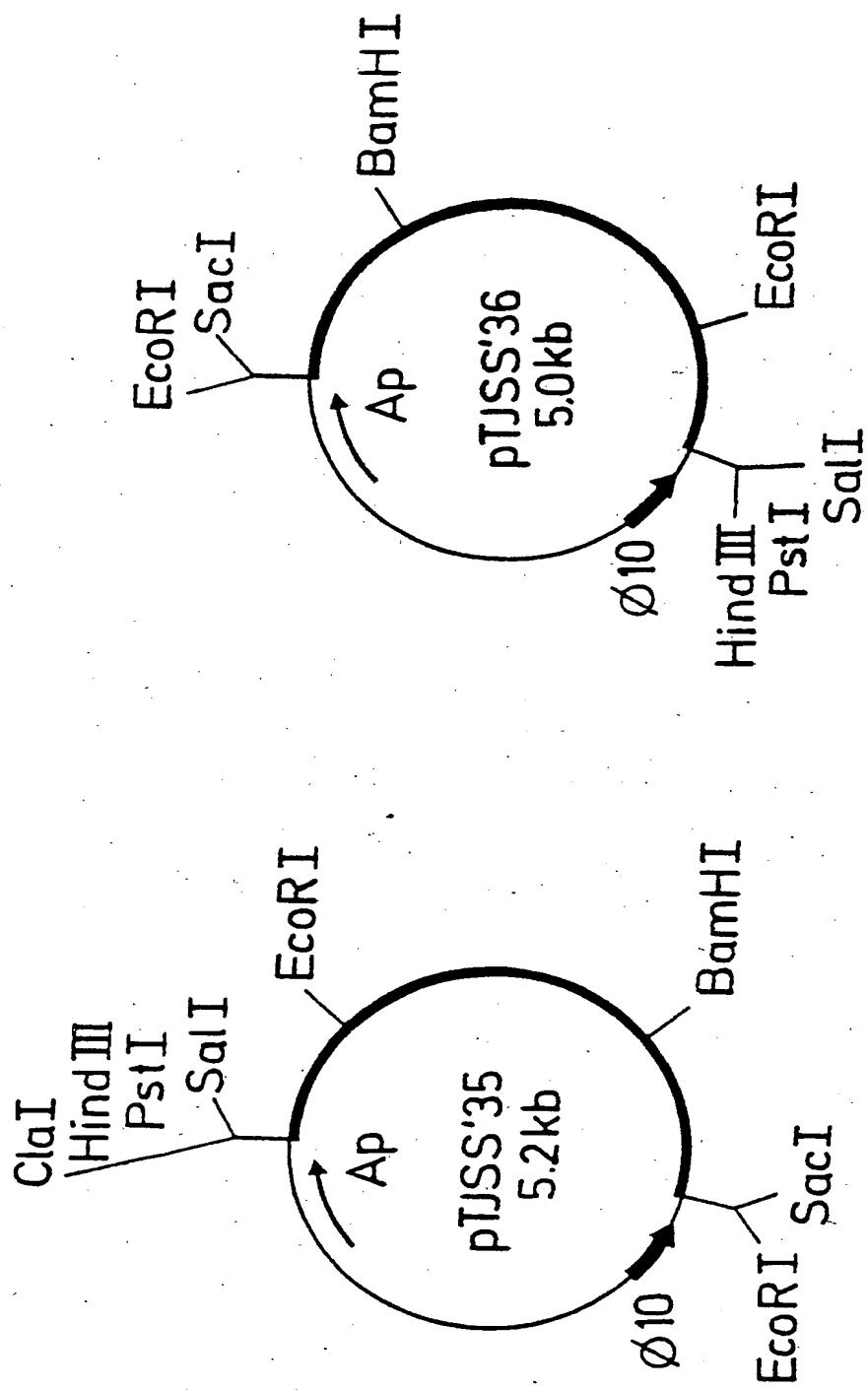
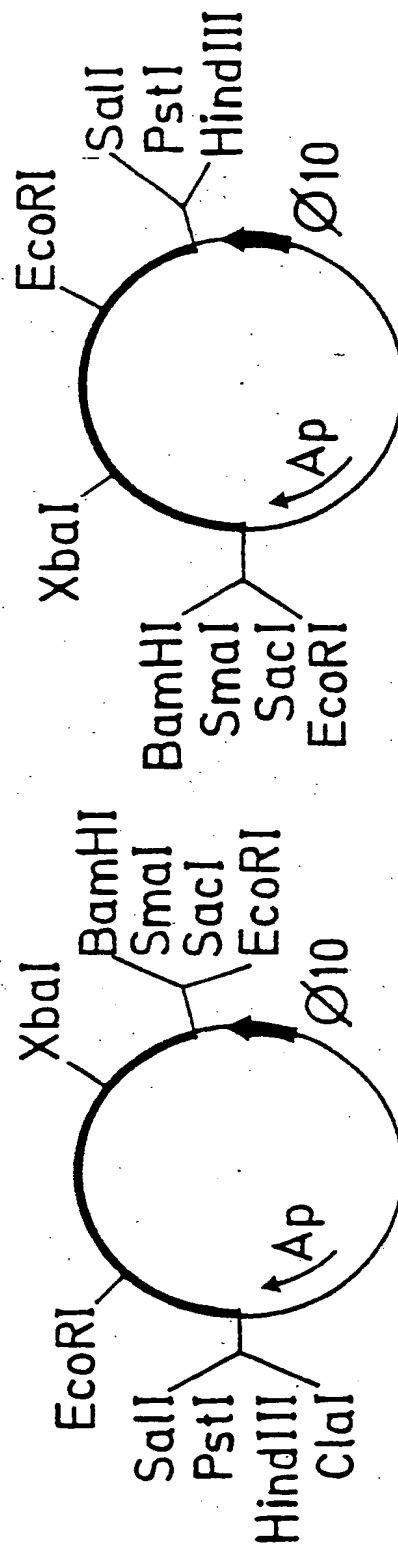


Abb. 5



pTJS'B436
4.2kb

pTJS'B435
4.4kb

Abb. 6

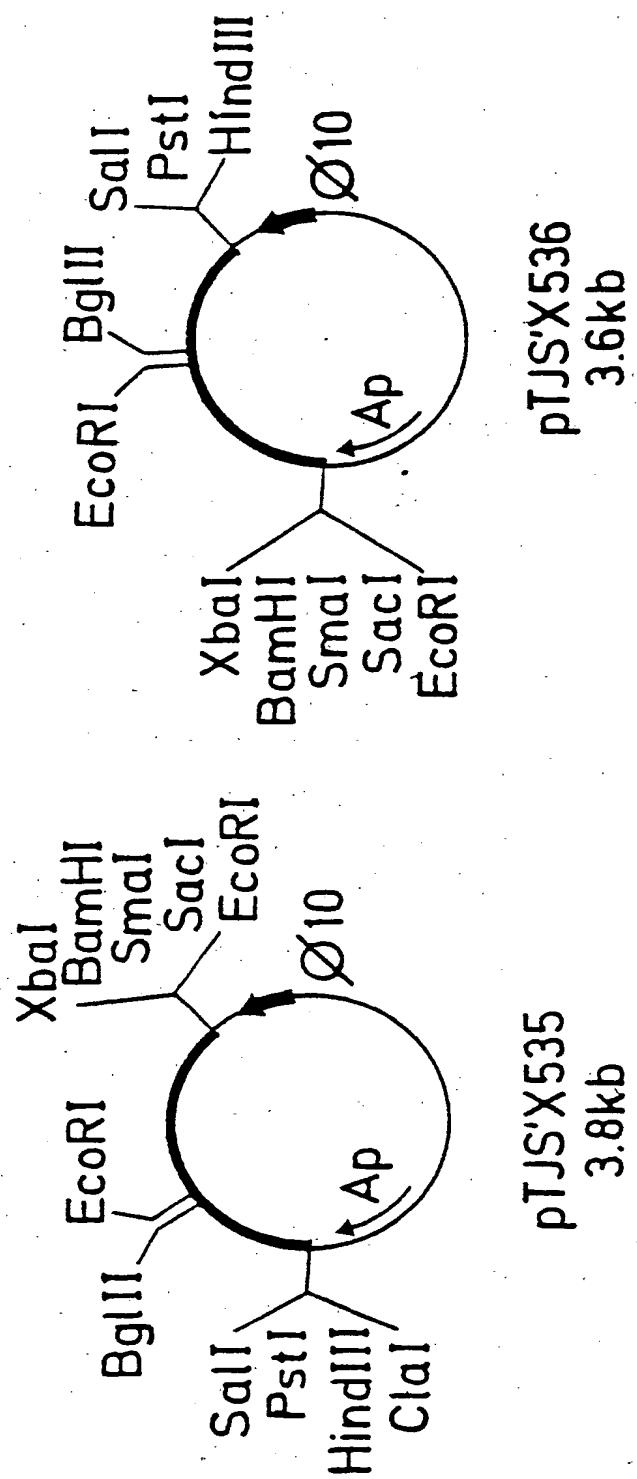


Abb.7a

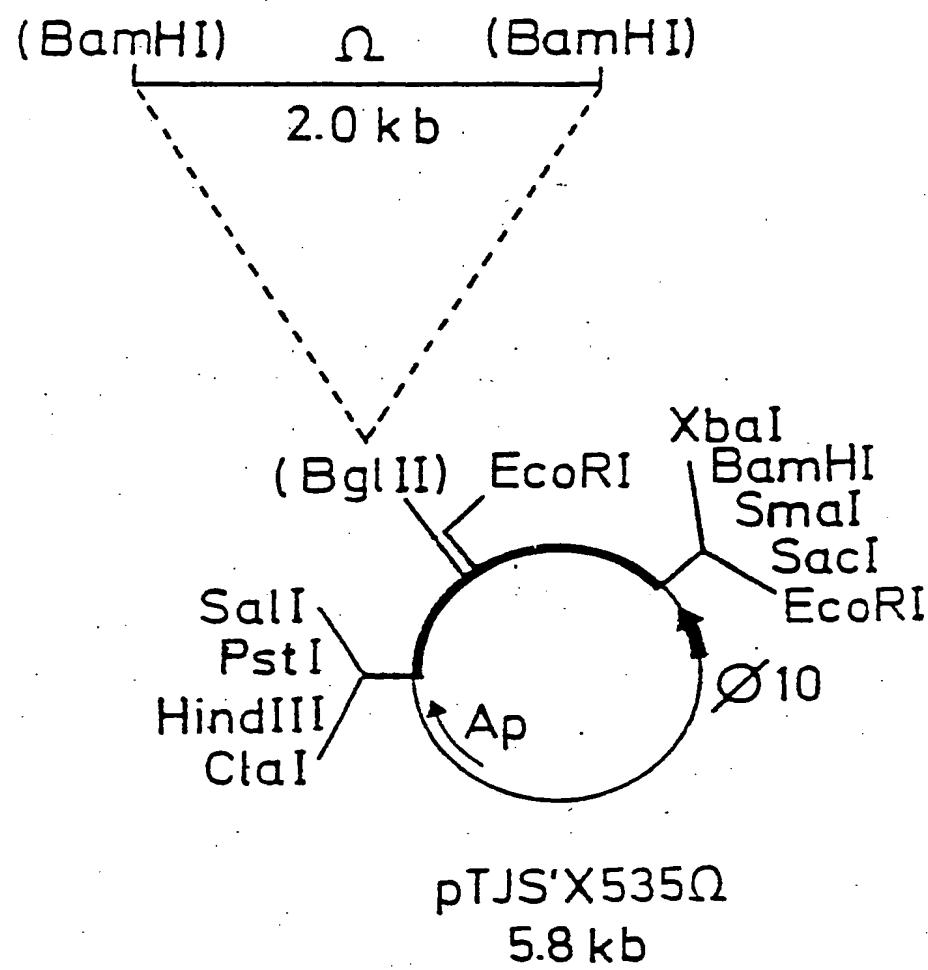
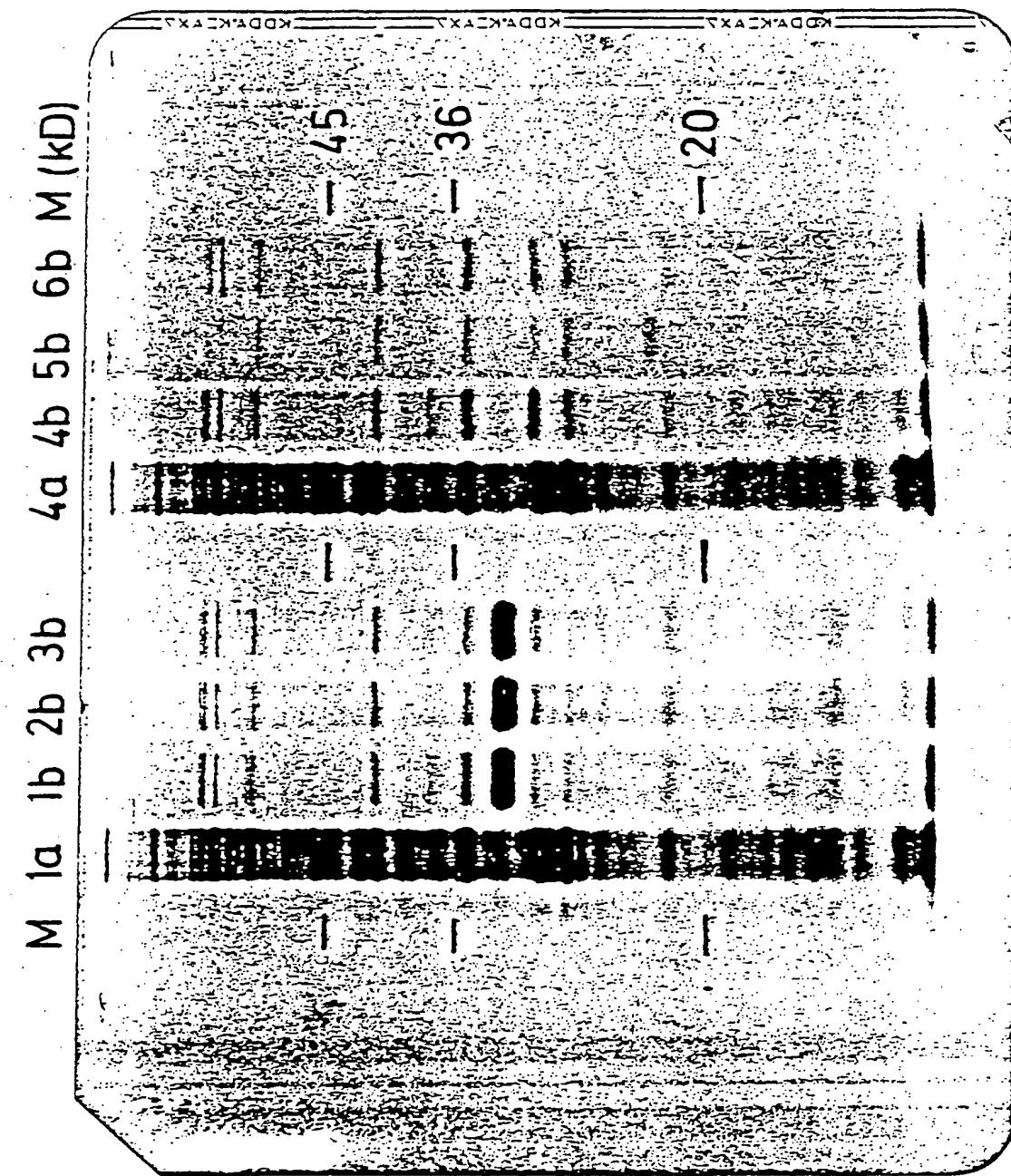


Abb. 7b



ERSATZBLATT

Abb. 8

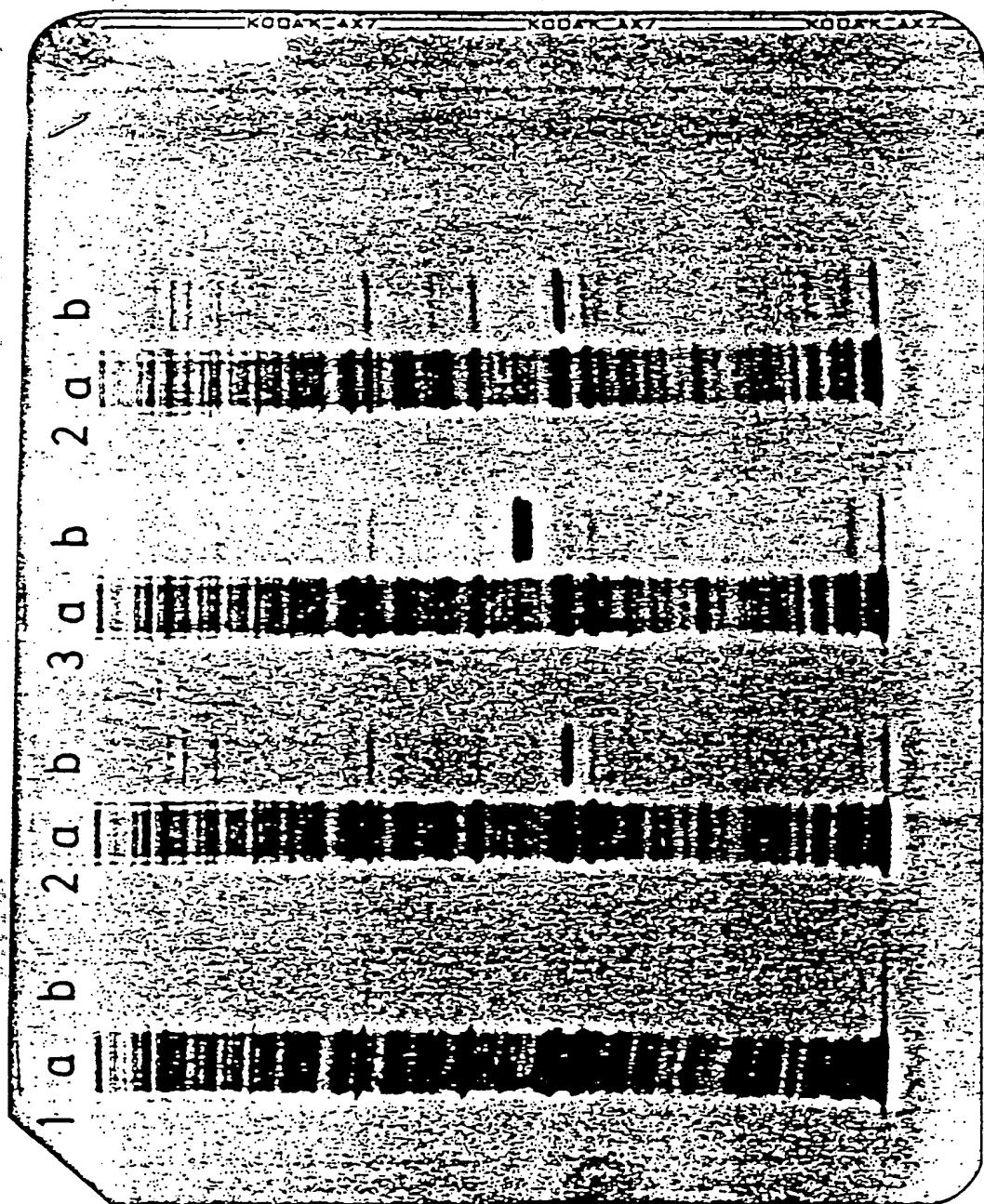


Abb. 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/DE 87/00392

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) *

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl.: ⁴ C 12 N 1/20; C 12 N 15/00; C 07 H 21/04; C 12 P 21/02;
 Int.Cl.: // (C 12 N 1/20, C 12 R 1:05, 1:19, 1:38)

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ⁷

Classification System	Classification Symbols
Int.Cl. ⁴ :	C 12 N; C 12 R

Documentation Searched other than Minimum Documentation
 to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *

Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	Chemical Abstracts, vol. 103, No: 3, 22 July 1985, (Columbus, Ohio, US), P.S. Amy et al.: "Characterization of aquatic bacteria and cloning of genes specifying partial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid", see page 154, abstract 17761s, Appl. Environ. Microbiol. 1985, 49(5), 1237-45	4, 23-25, 27, 28, 31 1-3
A	-----	
X	Chemical Abstracts, vol. 99, No: 9, 29 August 1983, (Columbus, Ohio, US), B. Friedrich et al.: "Transfer and expression of the herbicide-degrading plasmid pJP4 in aerobic autotrophic bacteria", see page 159, abstract 65163u, & Arch. Microbiol. 1983, 134(2), 92-7 (cited in the application)	4, 25-29, 31
A	-----	1-3
Y	Chemical Abstracts, vol. 102, No: 19, 13 May 1985, (Columbus, Ohio, US), R.H. Don et al.: "Transposon mutagenesis and cloning analysis of the pathways for degradation of 1- ./. .	

* Special categories of cited documents: ¹⁰

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report
8 December 1987 (08.12.87)	22 January 1988 (22.01.88)
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer
European Patent Office	

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
	2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 3-chloro-benzoate in <i>Alcaligenes eutrophus</i> JMP134 (pJP4)", see page 157, abstract 161446q, & <i>J. Bacteriol.</i> 1985, 161(1), 85-90 (cited in the application) -- Y Chemical Abstracts, vol. 102, No: 13, April 1985, (Columbus, Ohio, US), R.H. Don et al.: "Genetic and physical map of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid pJP4", see page 162, abstract 107177q, & <i>J. Bacteriol.</i> 1985, 161(1), 466-8 (cited in the application) --	1-4,23-31 1-4,23-31
P,X	Biological Abstracts, vol. 84, No: 7, 1987, (Philadelphia, Pa., US), W.R. Streber et al.: "Analysis, cloning, and high-level expression of 2,4-D monooxygenase gene tfdA of <i>Alcaligenes eutrophus</i> JMP134", see abstract 66315, & <i>J. Bacteriol.</i> 169, (7), 2950-2955 -----	1-31

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 87/00392

I. KLASSEFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben)⁶

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC
 Int. Cl. 4 C 12 N 1/20; C 12 N 15/00; C 07 H 21/04; C 12 P 21/02; //
 (C 12 N 1/20, C 12 R 1:05, 1:19, 1:38)

II. RECHERCHIERTE SACHGEBiete

Recherchierter Mindestprüfstoff⁷

Klassifikationssymbole

Int. Cl. 4	C 12 N; C 12 R
------------	----------------

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese
 unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹

Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. 13
X	Chemical Abstracts, Band 103, Nr. 3, 22. Juli 1985, (Columbus, Ohio, US), P.S. Amy et al.: "Characterization of aquatic bacteria and cloning of genes specifying partial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid", siehe Seite 154, Zusammenfassung 17761s, & Appl. Environ. Microbiol. 1985, 49(5), 1237-45	4, 23-25, 27, 28, 31
A	--	1-3
X	Chemical Abstracts, Band 99, Nr. 9, 29. August 1983, (Columbus, Ohio, US), B. Friedrich et al.: "Transfer and expression of the herbicide-degrading plasmid pJP4 in aerobic autotrophic bacteria", siehe Seite 159, Zusammenfassung 65163u, & Arch. Microbiol. 1983, 134(2), 92-7 (in der Anmeldung erwähnt)	4, 25-29, 31
A	--	1-3

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:
 - "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Dezember 1987

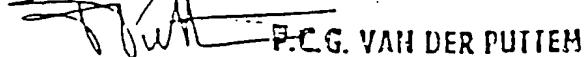
Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

22 JAN 1988

Internationale Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt

Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten

 P.C.G. VAN DER PUTTEM

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortszung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	Chemical Abstracts, Band 102, Nr. 19, 13. Mai 1985, (Columbus, Ohio, US), R.H. Don et al.: "Transposon mutagenesis and cloning analysis of the pathways for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 3-chlorobenzoate in <i>Alcaligenes eutrophus</i> JMP134(pJP4)", siehe Seite 157, Zusammenfassung 161446q, & J. Bacteriol. 1985, 161(1), 85-90 (in der Anmeldung erwähnt) --	1-4,23-31
Y	Chemical Abstracts, Band 102, Nr. 13, 1. April 1985, (Columbus, Ohio, US), R.H. Don et al.: "Genetic and physical map of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid pJP4", siehe Seite 162, Zusammenfassung 107177q, & J. Bacteriol. 1985, 161(1), 466-8 (in der Anmeldung erwähnt) --	1-4,23-31
P,X	Biological Abstracts, Band 84, Nr. 7, 1987, (Philadelphia, Pa., US) W.R. Streber et al.: "Analysis, cloning, and high-level expression of 2,4-D monooxygenase gene tfdA of <i>Alcaligenes eutrophus</i> JMP134", siehe Zusammenfassung 66315, & J. Bacteriol. 169, (7), 2950-2955 -----	1-31